

# THESE DE DOCTORAT

Biologie, Médecine, Santé

Université Jean Monnet de Saint-Etienne, Membre de l'Université de Lyon

Présentée et soutenue publiquement le **17 décembre 2012** par

**Rachel TERRASSE**

---

## **Transmission hétérosexuelle de HIV : Visualisation et modélisation de l'infection de la muqueuse génitale féminine.**

---

### **Membres du jury :**

- <b>Christiane MOOG</b>	Rapporteur	Inserm Unité 748 - Université de Strasbourg
- <b>François SIMON</b>	Rapporteur	CHU Saint-Louis - Université Paris VII
- <b>Nancy WILLKOMM</b>	Examineur	NowAIDS – Lyon Biopôle
- <b>Jean-Charles PINOLI</b>	Co-directeur de thèse	ENSM - Saint-Etienne
- <b>Bruno POZZETTO</b>	Directeur de thèse	Université Jean Monnet - Saint-Etienne
- <b>Thomas BOURLET</b>	Président du jury	Université Jean Monnet - Saint-Etienne



# THESE DE DOCTORAT

Biologie, Médecine, Santé

Université Jean Monnet de Saint-Etienne, Membre de l'Université de Lyon

Présentée et soutenue publiquement le **17 décembre 2012** par

**Rachel TERRASSE**

---

## **Transmission hétérosexuelle de HIV : Visualisation et modélisation de l'infection de la muqueuse génitale féminine.**

---

### Membres du jury :

- <b>Christiane MOOG</b>	Rapporteur	Inserm Unité 748 - Université de Strasbourg
- <b>François SIMON</b>	Rapporteur	CHU Saint-Louis - Université Paris VII
- <b>Nancy WILLKOMM</b>	Examineur	NowAIDS – Lyon Biopôle
- <b>Jean-Charles PINOLI</b>	Co-directeur de thèse	ENSM - Saint-Etienne
- <b>Bruno POZZETTO</b>	Directeur de thèse	Université Jean Monnet - Saint-Etienne
- <b>Thomas BOURLET</b>	Président du jury	Université Jean Monnet - Saint-Etienne





# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Christiane Moog ainsi que le Professeur François Simon de m'avoir fait l'honneur de bien vouloir évaluer ma thèse de Doctorat.

Je remercie également le Docteur Nancy Willkomm d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineur, et pour ses nombreux conseils professionnels.

Je remercie vivement le Professeur Bruno Pozzetto, directeur du laboratoire GIMAP et directeur de ma thèse pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire pendant ces trois années et d'avoir dirigé ma thèse.

Je remercie également le Professeur Thomas Bourlet d'accepter de présider ce jury, pour avoir encadré ma thèse, s'être rendu disponible et pour ses conseils.

Je remercie également les membres du Pôle Optique de Saint-Etienne, notamment Sabine Palle pour toutes ces heures passées dans le noir à tenter de visualiser des taches rouges et vertes, mais également pour ses conseils, son aide inestimable et son soutien moral.

Je remercie les autres personnes sans qui ce projet de thèse n'aurait pu aboutir, l'équipe de Guido Vanham à Anvers (Belgique), notamment Leo Heyndrickx, pour la construction des virus chimériques, mais également les personnes de l'Ecole des Mines, notamment Yacine Hadjali, Yann Gavet et Jean-Charles Pinoli, mon codirecteur de thèse, pour leur aide dans l'analyse et la segmentation des images confocales.

Je remercie tout autant Phil pour ses conseils scientifiques et son aide technique, ainsi qu'Olivier D.

Je remercie la région Rhône-Alpes et l'ex cluster-10 infectiologie (ARC Santé), pour le financement de ma thèse via une ADR régionale.

Je remercie les patients HIV de Saint-Etienne pour leurs dons de prélèvement de sang et de sperme. Je remercie également vivement les médecins et les infirmières du département des maladies infectieuses du CHU de Saint-Etienne, pour leur disponibilité, leur amabilité et leur dévouement pour la récupération des prélèvements.

Je remercie les enseignants de l'Université Jean Monnet qui m'ont permis de dispenser des travaux dirigés et des travaux pratiques aux étudiants de licence et de médecine.

# SOMMAIRE

Sommaire .....	7
Résumé .....	12
Abstract .....	14
Index des abréviations.....	16
Liste des figures et tableaux.....	21
Introduction générale.....	24
Données Bibliographiques.....	27
Introduction.....	28
I.    Historique .....	28
II.   Epidémiologie .....	29
III.  De l'infection HIV au SIDA .....	32
HIV .....	34
I.    Structure.....	34
A.  Morphologie du virus .....	34
B.  Génome viral .....	34
C.  Protéines virales .....	36
1.  Protéines de structure.....	37
2.  Enzymes virales .....	39
3.  Glycoprotéines d'enveloppe .....	40
a.  gp120.....	41
b.  gp41.....	42
4.  Protéines accessoires et régulatrices .....	43
a.  Rev (Regulator of viral expression).....	43
b.  Tat ( <i>Trans</i> -activator of transcription) .....	44
c.  Nef (HIV Negative factor) .....	44
d.  Vif (Virion infectivity factor) .....	45
e.  Vpr (Viral protein regulatory) .....	45
f.  Vpu (Viral protein unknown) .....	46
I.    Cycle de réplication .....	46
A.  Etapas précoces.....	47
1.  Entrée .....	47
a.  Attachement et fusion.....	48
b.  Décapsidation et transcription inverse .....	49
2.  Import nucléaire .....	49

3. Intégration.....	50
B. Etapes tardives .....	51
1. Transcription.....	51
2. Assemblage.....	52
3. Bourgeonnement et maturation .....	53
II. Variabilité génétique .....	54
A. Les variants génétiques de HIV .....	54
B. Causes de la variabilité génétique de HIV .....	57
III. Cibles de HIV.....	57
A. Récepteurs.....	57
1. Récepteur principal : la molécule CD4 .....	58
2. Corécepteurs de CD4.....	59
a. CXCR4 .....	60
b. CCR5.....	60
3. Récepteurs alternatifs .....	62
a. Galactosyl Céramide (GalCer).....	62
b. Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPG) .....	62
c. Gp340 .....	63
d. Récepteurs aux Lectines C.....	64
B. Cellules réceptrices au niveau des muqueuses.....	65
1. Lymphocytes T CD4 (LT CD4).....	65
2. Cellules dendritiques (DC) .....	66
3. Cellules de Langerhans (LC).....	67
4. Monocytes/Macrophages .....	67
5. Autres cellules cibles .....	68
a. Cellules épithéliales génitales féminines.....	68
b. Plaquettes.....	69
c. Cellules Natural Killer (NK) .....	69
d. Lymphocytes B (LB) .....	70
Transmission hétérosexuelle.....	71
I. Tropisme et sélection R5 .....	71
A. Terminologie.....	71
B. Déterminants du tropisme .....	71
1. Boucle V3 de gp120.....	72

a.	Conformation de la boucle V3.....	73
b.	Charge globale et composition en N-glycosylations .....	73
2.	La région V1-V2 de gp120.....	74
3.	Régions conservées de gp120 .....	75
4.	Protéine gp41 .....	75
C.	Sélection R5 .....	76
1.	Sélection dans le tractus génital masculin .....	76
2.	Sélection dans le tractus génital féminin .....	77
II.	Compartimentation et réservoirs.....	79
A.	Notion de compartimentation .....	79
B.	Notion de réservoir viral.....	80
III.	Traitements .....	81
IV.	HIV et transmission hétérosexuelle.....	83
A.	Le tractus génital féminin.....	83
1.	Composition et sites de pénétration.....	83
a.	Cellules épithéliales.....	83
b.	Cellules immunitaires de la muqueuse .....	84
2.	Mécanismes de défense de la muqueuse génitale féminine .....	85
a.	Composés sécrétés.....	86
b.	Composés associés aux cellules .....	87
c.	Composés sécrétés après induction.....	87
B.	Le tractus génital masculin .....	88
1.	Compartiment cellulaire.....	88
2.	Compartiment plasmatique .....	89
C.	Interactions muqueuses – sperme – HIV .....	90
V.	Mécanismes de franchissement des muqueuses.....	93
A.	Transcytose.....	95
B.	Prise en charge par et/ou infection des cellules immunitaires sous-muqueuses.....	96
C.	Brèches dans la muqueuse .....	96
D.	Infection des cellules épithéliales génitales .....	97
E.	Transmigration .....	98
	Modélisation des interactions virus-cellules.....	100
I.	Marquages fluorescents et techniques de visualisation .....	100
A.	Techniques de visualisation microscopique en fluorescence .....	100

1. Microscopie à épi-fluorescence.....	100
2. Microscopie confocale.....	101
3. Imagerie en temps réel.....	104
4. Autres techniques de visualisation.....	105
B. Outils virologiques.....	109
1. Marquages indirects.....	110
2. Pseudovirus « one-shot » .....	111
3. Virus chimériques.....	113
II. Modèles d'études biologiques .....	116
A. Modèles in vitro.....	116
B. Modèles ex vivo.....	119
C. Modèles in vivo .....	121
Objectifs du travail .....	124
Résultats expérimentaux.....	127
Article I: Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma .....	128
I. But de l'étude .....	128
II. Article publié .....	129
III. Synthèse .....	142
Article II: Direct Visualization of X4 and R5 replicative fluorescent HIV-1 viruses in human endocervical cells .....	143
I. But de l'étude .....	143
II. Article soumis à publication .....	144
III. Synthèse .....	164
Discussion générale et perspectives .....	166
Annexes .....	177
Participation aux activités de recherche du laboratoire .....	178
Communications orales et affichées .....	180
Références.....	183

# RESUME



La transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme est le principal mode de contamination dans le monde. Il implique la mise en contact du sperme infecté avec la muqueuse génitale féminine saine, puis le passage du virus libre ou associé aux cellules à travers la muqueuse. Les mécanismes impliqués dans la transmission de HIV de l'homme vers la femme ainsi que l'impact du plasma séminal sur la transmission sélective des virus à tropisme R5 sont encore mal connus.

Au cours de mon séjour doctoral nous avons visualisé le passage du virus associé aux cellules ainsi que du virus libre à travers la muqueuse génitale endocervicale. Dans un premier temps l'étude s'est focalisée sur la transmigration de cellules immunitaires infectées par HIV à travers un modèle *in vitro* de muqueuse endocervicale reconstruite, ainsi que sur le rôle du plasma séminal dans la transmission de HIV et la sélection des virus à tropisme R5. Par la suite, un virus chimérique fluorescent, répliquatif et infectieux, permettant sa détection par microscopie confocale sur plusieurs cycles de réplication, a été développé. Après mise en contact de ce virus chimérique, à tropisme X4 ou R5, avec la muqueuse endocervicale, nous avons visualisé par microscopie confocale l'infection des cellules épithéliales endocervicales et la transmission de HIV à des cellules immunitaires disposées au pôle basal. L'utilisation d'un modèle mathématique nous a permis de standardiser et quantifier la détection de cellules infectées dans la muqueuse.

Mes travaux de thèse décrivent dans un premier temps l'importance du passage de HIV associé aux cellules dans la transmission hétérosexuelle, ainsi que l'implication du plasma séminal dans la sélection des virus à tropisme R5. De plus, le modèle virologique développé permet de visualiser directement la transmission hétérosexuelle de HIV à travers la muqueuse génitale féminine. J'ai ainsi démontré qu'il est possible de visualiser directement, de localiser et de quantifier la présence du virus au sein de la muqueuse. Cet outil virologique permettra d'approfondir les connaissances et la compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV et dans la sélection des virus à tropisme R5.

# ABSTRACT

Heterosexual transmission of HIV from men to women is the main route of contamination by this agent worldwide. This mode of transmission involves the contact between infected semen and healthy female genital mucosa, and then the crossing of cell-free or cell-associated viruses through the mucosa. The mechanisms involved in HIV transmission from men to women as well as the role of seminal plasma in selective transmission of R5-tropic viruses stay partially unknown.

During the course of my PhD we visualized the crossing of cell-associated and cell-free virus through the endocervical genital mucosa. Initially, the study focused on the transmigration of infected immune cells through an in vitro model of endocervical mucosa, as well as on the role of seminal plasma in HIV transmission and selection of R5-tropic strains. Afterwards, we developed a fluorescent, replicative competent, infectious chimeric virus allowing its detection by confocal microscopy after several replication cycles. After contact of the endocervical mucosa with X4- or R5-tropic chimeric viruses, we visualized by confocal microscopy the infection of endocervical epithelial cells and the transmission of HIV to immune cells placed in the basal compartment. The use of a mathematical model allowed standardizing and quantifying the detection of infected cells in the mucosa.

My PhD work describes as a first step the importance of the crossing of cell-associated HIV particles in the heterosexual transmission, as well as the involvement of seminal plasma in the selection of R5-tropic strains. Moreover, the virological model developed herein allows the direct visualization of HIV transmission through the female genital mucosa. I have thus demonstrated that it is possible to localize and quantify viral particles within the mucosa. This virological tool help to better understand the mechanisms involved in HIV heterosexual transmission and the selection of R5-tropic strains.

# INDEX DES ABREVIATIONS

<b>ADN :</b>	<b>A</b> cide <b>D</b> éoxyribo <b>N</b> ucléique
<b>ADNc :</b>	<b>ADN</b> complémentaire
<b>ALV :</b>	<b>A</b> vian <b>L</b> eukosis <b>V</b> irus
<b>APOBEC3G :</b>	<b>A</b> polipoprotein <b>B</b> mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like <b>3G</b>
<b>ARN :</b>	<b>A</b> cide <b>R</b> ibo <b>N</b> ucléique
<b>ARNm :</b>	<b>ARN</b> messenger
<b>ARV :</b>	<b>A</b> IDS-associated <b>r</b> etro <b>v</b> iruses
<b>BG :</b>	<b>O</b> <sup>6</sup> - <b>b</b> enzyl <b>g</b> uanine
<b>BiFC :</b>	<b>B</b> imolecular <b>F</b> luorescence <b>C</b> omplementation
<b>BIV :</b>	<b>B</b> ovine <b>I</b> mmunodeficiency-like <b>V</b> irus
<b>C1-C5 :</b>	Régions constantes <b>1 à 5</b>
<b>Ca/p24 :</b>	<b>C</b> apside
<b>CAEV :</b>	<b>C</b> aprine <b>A</b> rthritis <b>E</b> ncephalitis <b>V</b> irus
<b>CCL :</b>	Chemokine ( <b>C-C</b> motif) ligand
<b>CCR5 :</b>	<b>C-C</b> chemokine receptors type <b>5</b>
<b>CD :</b>	<b>C</b> luster de <b>D</b> ifférentiation
<b>CEM :</b>	<b>C</b> ellules épithéliales de <b>M</b> alassez
<b>CFP :</b>	<b>C</b> yan <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein
<b>CFSE :</b>	<b>C</b> arboxyfluorescein <b>S</b> uccinimidyl <b>E</b> ster
<b>CHR :</b>	<b>C</b> arboxy-terminal <b>h</b> eptad repeats
<b>CLR :</b>	<b>R</b> écepteur aux <b>L</b> ectines de type <b>C</b>
<b>CMH :</b>	<b>C</b> omplexe <b>M</b> ajeur d' <b>H</b> istocompatibilité
<b>CMV :</b>	<b>C</b> ytomégalovirus
<b>CPA :</b>	<b>C</b> ellule <b>p</b> réseñtatrice des <b>a</b> ntigènes
<b>Cpz :</b>	<b>C</b> himpanzé
<b>CRF :</b>	<b>C</b> irculating <b>R</b> ecombinant <b>F</b> orm
<b>C-ter :</b>	Extrémité <b>c</b> arboxy- <b>t</b> erminale
<b>CXCR4 :</b>	<b>CX</b> chemokine receptors type <b>4</b>
<b>CypA :</b>	<b>C</b> yclophiline <b>A</b>
<b>DC :</b>	<b>D</b> endritic cells
<b>DC-SIGN :</b>	<b>C</b> -type lectin <b>DC</b> -specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-grabbing nonintegrin
<b>DC-SIGNR :</b>	<b>DC-SIGN</b> Related protein
<b>ECL:</b>	<b>E</b> xtracellular loop
<b>e.g. :</b>	<b>E</b> xempli <b>g</b> ratia
<b>eGFP :</b>	<b>e</b> nhanced <b>G</b> reen <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein
<b>EIAV :</b>	<b>E</b> quine <b>I</b> nfectious <b>A</b> nemia <b>V</b> irus
<b>Env :</b>	<b>E</b> nveloppe
<b>ESCRT :</b>	<b>E</b> ndosomal <b>s</b> orting <b>c</b> omplex required for <b>t</b> ransport
<b>FFS :</b>	<b>F</b> luorescence <b>F</b> luctuation <b>S</b> pectroscopy
<b>FITC :</b>	<b>F</b> luorescein <b>I</b> so <b>T</b> hio <b>C</b> yanate
<b>FIV :</b>	<b>F</b> eline <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus
<b>FP :</b>	<b>F</b> usion <b>P</b> eptide
<b>FRAP :</b>	<b>F</b> luorescence <b>R</b> ecovery <b>A</b> fter <b>P</b> hotobleaching
<b>FRET :</b>	<b>F</b> örster <b>R</b> esonance <b>E</b> nergy <b>T</b> ransfer
<b>G2/M :</b>	<b>G</b> ap <b>2</b> / <b>M</b> itosis

<b>Gal AAG :</b>	<b>Galactosyl Alkyl-Acyl Glycérol</b>
<b>GalCer :</b>	<b>Galactosyl Céramide</b>
<b>GALT :</b>	<b>Gut Associated Lymphoid Tissue</b>
<b>GFP :</b>	<b>Green Fluorescent Protein</b>
<b>GM-CSF :</b>	<b>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</b>
<b>Gp160 :</b>	<b>Glycoprotéine d'enveloppe de 160kDa</b>
<b>GPR :</b>	<b>G Protein-coupled Receptor</b>
<b>Groupe M :</b>	<b>Groupe majoritaire</b>
<b>Groupe N :</b>	<b>Groupe non M, non O</b>
<b>Groupe O :</b>	<b>Groupe outlier ou outgroup</b>
<b>hBD :</b>	<b>Human <math>\beta</math>-Defensine</b>
<b>HCV :</b>	<b>Hepatitis C Virus</b>
<b>HIV :</b>	<b>Human Immunodeficiency Virus</b>
<b>HSPG :</b>	<b>Heparan Sulfate ProteoGlycans</b>
<b>HSV :</b>	<b>Herpès Simplex Virus</b>
<b>HTLV :</b>	<b>Human T-Lymphotropic Virus</b>
<b>i.e. :</b>	<i>id est</i> (c'est à dire)
<b>ICAM :</b>	<b>InterCellular Adhesion Molecule</b>
<b>ICL :</b>	<b>IntraCellular Loop</b>
<b>IEL :</b>	<b>Intra-Epithelial Lymphocytes</b>
<b>IFN :</b>	<b>Interféron</b>
<b>Ig :</b>	<b>Immunoglobuline</b>
<b>IL :</b>	<b>Interleukine</b>
<b>IN :</b>	<b>Intégrase</b>
<b>INI 1 :</b>	<b>Integrase interactor 1</b>
<b>IRES :</b>	<b>Internal ribosome entry site</b>
<b>kDa :</b>	<b>kilo Dalton</b>
<b>LAV :</b>	<b>Lymphadenopathy-Associated Virus</b>
<b>LB :</b>	<b>Lymphocyte B</b>
<b>LC :</b>	<b>Cellule de Langerhans</b>
<b>LDL :</b>	<b>Low Density Lipids</b>
<b>LE :</b>	<b>Late Endosome</b>
<b>LEDGF /p75 :</b>	<b>Lens Epithelium-Derived Growth Factor</b>
<b>LP :</b>	<b>Lamina Propria</b>
<b>LP NK :</b>	<b>Cellules NK situées dans la Lamina Propria</b>
<b>LT :</b>	<b>Lymphocyte T</b>
<b>LTR :</b>	<b>Long Terminal Repeats</b>
<b>MA/p17 :</b>	<b>Matrice</b>
<b>Mac :</b>	<b>Macaque</b>
<b>MBL :</b>	<b>Mannose Binding Lectin</b>
<b>MCP :</b>	<b>Monocyte chemotactic protein</b>
<b>MDM :</b>	<b>Monocyte-Derived Macrophage</b>
<b>MIP :</b>	<b>Macrophage Inflammatory Protein</b>
<b>MMR :</b>	<b>Macrophage Mannose Receptor</b>
<b>MPER :</b>	<b>Membrane-Proximal External Region</b>

<b>MR :</b>	<b>R</b> écepteurs au <b>M</b> annose
<b>MuLV :</b>	<b>M</b> urine <b>L</b> eukemia <b>V</b> irus
<b>MVB :</b>	<b>M</b> ulti- <b>V</b> esicular <b>B</b> ody
<b>NC/p7 :</b>	<b>N</b> ucléo <b>C</b> apside
<b>Nef :</b>	<b>N</b> egative factor
<b>NF-κB :</b>	<b>N</b> uclear <b>F</b> actor- <b>κ</b> <b>B</b>
<b>NHR :</b>	<b>A</b> mino-terminal <b>h</b> eptad repeats
<b>NK :</b>	<b>N</b> atural <b>K</b> iller
<b>NSE :</b>	<b>N</b> uclear signal of <b>e</b> xport
<b>NSI :</b>	<b>N</b> on <b>S</b> yncytium <b>I</b> nducing
<b>NSMC :</b>	<b>N</b> on-Spermatozoa <b>M</b> ononuclear <b>C</b> ells
<b>N-ter :</b>	Extrémité <b>a</b> mino- <b>t</b> erminale
<b>OMS :</b>	<b>O</b> rganisation <b>M</b> ondiale pour la <b>S</b> anté
<b>P56<sup>lck</sup> :</b>	<b>L</b> ymphocyte-specific protein tyrosine kinase <b>p56</b>
<b>PALM :</b>	<b>P</b> hoto <b>A</b> ctivated <b>L</b> ocalization <b>M</b> icroscopy
<b>PAP :</b>	<b>P</b> rostatic <b>A</b> cidic <b>P</b> hosphatase
<b>PBMC :</b>	<b>P</b> eripheral <b>B</b> lood <b>M</b> ononuclear <b>C</b> ells
<b>pDC :</b>	<b>p</b> lasma <b>c</b> ytoïdes <b>D</b> endritic <b>C</b> ells
<b>pH :</b>	<b>p</b> otentiel <b>h</b> ydrogène
<b>PI(4,5)P<sub>2</sub> :</b>	<b>P</b> hosphatidylinositol <b>4,5</b> <b>bis</b> phosphate
<b>PIC :</b>	<b>C</b> omplexe de <b>P</b> ré- <b>I</b> ntégration
<b>PMT :</b>	<b>P</b> hoto <b>M</b> ultiplica <b>T</b> eur
<b>Pol :</b>	<b>P</b> olymérase
<b>PR :</b>	<b>P</b> rotéase
<b>Pr160 :</b>	<b>P</b> récurseur de <b>G</b> ag-pol de <b>160</b> kDa
<b>Pr55Gag :</b>	<b>P</b> récurseur de <b>G</b> ag de <b>55</b> kDa
<b>PRR :</b>	<b>P</b> attern <b>R</b> ecognition <b>R</b> eceptors
<b>PS :</b>	<b>P</b> lasma <b>S</b> éminal
<b>RANTES :</b>	<b>R</b> egulated upon <b>A</b> ctivation, <b>N</b> ormal <b>T</b> -cell <b>E</b> xpressed and <b>S</b> ecreted
<b>RE :</b>	<b>R</b> éticulum <b>E</b> ndoplasmique
<b>RESOLFT :</b>	<b>R</b> eversible <b>S</b> aturable <b>O</b> ptically <b>L</b> inear <b>F</b> luorescence <b>T</b> ransition
<b>Rev :</b>	<b>R</b> egulator of <b>v</b> iral expression
<b>RH :</b>	<b>R</b> apid/ <b>H</b> igh
<b>RNA pol :</b>	<b>ARN</b> <b>p</b> olymérase
<b>RNP :</b>	<b>C</b> omplexe <b>R</b> ibo <b>N</b> ucléo <b>P</b> rotéique
<b>RRE :</b>	<b>R</b> ev <b>R</b> esponse <b>E</b> lement
<b>RT/TI :</b>	<b>R</b> everse <b>T</b> ranscriptase/ <b>T</b> ranscriptase <b>I</b> nverse
<b>RTC :</b>	<b>R</b> everse <b>T</b> ranscription <b>C</b> omplex
<b>SDF-1 :</b>	<b>S</b> tromal <b>D</b> erived <b>F</b> actor- <b>1</b>
<b>SEVI :</b>	<b>S</b> emen-derived <b>E</b> nhancer of <b>V</b> irus <b>I</b> nfection
<b>SHIV :</b>	<b>S</b> imian <b>H</b> uman <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus
<b>SI :</b>	<b>S</b> yncytium <b>I</b> nducing
<b>sida :</b>	<b>S</b> yndrome d'immunodéficience <b>a</b> cquise
<b>SIV :</b>	<b>S</b> imian <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus
<b>SL :</b>	<b>S</b> low/ <b>L</b> ow

<b>SLPI :</b>	<b>S</b> ecretory <b>L</b> eukocytes <b>P</b> rotease <b>I</b> nhibitor
<b>SSIM :</b>	<b>S</b> aturated <b>S</b> tructured-Illumination <b>M</b> icroscopy
<b>STED :</b>	<b>S</b> timulated <b>E</b> mission <b>D</b> epletion
<b>STORM :</b>	<b>S</b> tochastic <b>O</b> ptical <b>R</b> econstruction <b>M</b> icroscopy
<b>SU/gp120 :</b>	<b>G</b> lycoprotéine de <b>s</b> urface de <b>120</b> kDa
<b>Tat :</b>	<i>T</i> rans-activator of <b>t</b> ranscription
<b>TCL :</b>	<b>T</b> -cell lymphocyte
<b>TCR :</b>	<b>T</b> -cell receptor
<b>TGF :</b>	<b>T</b> ransforming <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
<b>TIRF :</b>	<b>T</b> otal <b>I</b> nternal <b>R</b> eflection <b>F</b> luorescence
<b>TLR :</b>	<b>T</b> oll <b>L</b> ike <b>R</b> eceptor
<b>TM/gp41 :</b>	<b>G</b> lycoprotéine <b>t</b> ransmembranaire de <b>41</b> kDa
<b>TNF :</b>	<b>T</b> umor <b>N</b> ecrosis <b>F</b> actor
<b>Tsg 101 :</b>	<b>T</b> umor susceptibility <b>g</b> ene <b>101</b>
<b>UV :</b>	<b>U</b> ltra- <b>V</b> iolet
<b>V1-V5 :</b>	Régions <b>V</b> ariables <b>1</b> à <b>5</b>
<b>Vif :</b>	<b>V</b> iral infectivity <b>f</b> actor
<b>VMV :</b>	<b>V</b> isna- <b>M</b> aedi <b>V</b> irus
<b>Vpr :</b>	<b>V</b> iral <b>p</b> rotein <b>r</b> egulatory
<b>Vpu :</b>	<b>V</b> iral <b>p</b> rotein <b>u</b> nknown
<b>Vpx :</b>	<b>V</b> iral <b>p</b> rotein <b>x</b>
<b>VSV-g :</b>	<b>V</b> esicular <b>S</b> tomatitis <b>V</b> irus <b>g</b>
<b>WT :</b>	<b>W</b> ild <b>T</b> ype
<b>YFP :</b>	<b>Y</b> ellow <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein



# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<u>Figure 1</u> : Visualisation par microscopie électronique à transmission de particules HIV-1 .....	29
<u>Figure 2</u> : Distribution de la prévalence de la répartition de HIV à l'échelle régionale chez les adultes en 2009.....	30
<u>Figure 3</u> : Evolution des différents marqueurs impliqués dans l'infection HIV, en fonction de la phase de la maladie, en absence de traitement.....	33
<u>Figure 4</u> : Présentation schématique du génome, des précurseurs protéiques et de protéines codées par HIV-1 ainsi que de la structure de la particule virale. ....	35
<u>Figure 5</u> : Présentation schématique de la structure de la particule virale HIV-1 et des protéines virales qui la composent. ....	37
<u>Figure 6</u> : Représentation schématique de la structure du précurseur d'enveloppe gp160, composée des protéines gp120 et gp41.....	40
<u>Figure 7</u> : Représentations schématiques de la structure de gp120.....	42
<u>Figure 8</u> : Cycle de réplication de HIV.....	47
<u>Figure 9</u> : Représentation schématique des étapes d'attachement et de fusion des membranes. ....	48
<u>Figure 10</u> : Représentation schématique et par microscopie électronique des transitions morphologiques et biologiques des virions HIV-1 pendant la maturation. ....	54
<u>Figure 11</u> : Distribution phylogénétique des groupes viraux de HIV-1. ....	55
<u>Figure 12</u> : Distribution géographique des variant de HIV. ....	56
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique du récepteur CD4 en association avec la protéine p56lck....	58
<u>Figure 14</u> : Représentation schématique des corécepteurs de HIV : CXCR4 et CCR5. ....	59
<u>Figure 15</u> : Proposition d'interactions entre les domaines V1-V2, V3 et C4 de la glycoprotéine gp120 de HIV. ....	72
<u>Figure 16</u> : Schéma représentant la structure de la boucle V3 de la protéine gp120 de HIV-1 (souche à tropisme X4). ....	74
<u>Figure 17</u> : Théorie des multiples barrières agissant sur la sélection des virus à tropisme R5.....	78
<u>Figure 18</u> : Représentation schématique et coupes histologiques de l'appareil génital féminin et des muqueuses le composant. ....	84
<u>Figure 19</u> : Les différentes voies de passage de HIV à travers la barrière muqueuse génitale féminine. ....	94

<u>Figure 20</u> : Cellules dendritiques reportrices infectées par HIV-1 visualisées par microscopie à épifluorescence. ....	101
<u>Figure 21</u> : Principe de la microscopie confocale. ....	102
<u>Figure 22</u> : Visualisation par microscopie confocale de cellules infectées par HIV. ....	103
<u>Figure 23</u> : Visualisation des sites de bourgeonnement de particules virales HIV sur des LT par STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy).....	106
<u>Figure 24</u> : Principe des techniques FRET (Förster Resonance Energy Transfer) et BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). ....	108
<u>Figure 25</u> : Section fine de particules HIV dans une vacuole cytoplasmique et dans le milieu extracellulaire de cellules infectées vues en microscopie électronique à transmission.....	109
<u>Figure 26</u> : Représentations schématiques de modèles de muqueuse reconstruite sur filtre et de coupes histologiques des muqueuses.....	117
 <u>Tableau 1</u> : Contribution des sites d'invasion de HIV à la pandémie. ....	 31
<u>Tableau 2</u> : Liste non exhaustive des corécepteurs principaux et alternatifs de HIV et leurs ligands naturels.....	61
<u>Tableau 3</u> : Synthèse non exhaustive des avantages et limites des différents marquages et des techniques de visualisation utilisées dans les études sur HIV.....	115
<u>Tableau 4</u> : Synthèse comparative des principaux avantages et limites observés dans l'utilisation des différents types de modèles de muqueuses génitales féminines <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> . ....	123

# INTRODUCTION GENERALE

HIV est un rétrovirus complexe, responsable de la pandémie mondiale de la maladie SIDA qui se manifeste par une déficience immunitaire chez la personne contaminée. Ce virus, dont la découverte en 1983 par Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi et collaborateurs a été récompensée par un prix Nobel de Médecine en 2008, se transmet majoritairement par voie hétérosexuelle, de l'homme vers la femme. Ce mode de transmission implique le contact du sperme infecté avec la muqueuse génitale féminine saine.

HIV peut avoir divers tropismes en fonction du corécepteur utilisé pour l'infection. En effet, les virus à tropisme X4 utilisent le corécepteur CXCR4, les virus à tropisme R5 utilisent le corécepteur CCR5 et les virus dual-tropiques peuvent utiliser indifféremment CXCR4 ou CCR5 pour entrer dans les cellules cibles.

Lors de la transmission de HIV, les personnes primo-infectées présentent majoritairement des virus à tropisme R5, alors que les personnes infectées depuis une longue période montrent majoritairement des particules virales à tropisme X4. De plus, les personnes présentant une délétion du gène codant le CCR5, donc n'exprimant pas ce corécepteur, sont protégées de l'infection par HIV. Ainsi, il existe une sélection des virus à tropisme R5 lors de la transmission de HIV, notamment lors de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme.

Le virus est présent dans le sperme sous deux formes : 1) libre, dans le plasma séminal, ou 2) associé aux cellules mononucléées du sperme (NSMC). Il peut traverser la muqueuse génitale féminine saine pour atteindre le système immunitaire sous-muqueux, être transféré au niveau des ganglions lymphatiques et établir une infection systémique. Le plasma séminal semble jouer un rôle important dans la transmission de HIV, notamment via le recrutement de cellules immunitaires sous-muqueuses au niveau du site de contact, ainsi que par l'induction de la production par les cellules épithéliales de cytokines et chimiokines variées qui vont jouer un rôle pro- ou anti-inflammatoire. De plus, la présence de virus à tropisme R5, X4 et dual-tropiques dans le sperme d'hommes infectés suggère que la sélection des virus à tropisme R5 observée lors d'une transmission hétérosexuelle intervient, au moins en partie, au niveau de la muqueuse génitale féminine. Les mécanismes de passage du virus à travers la muqueuse et le rôle exact de cette muqueuse ainsi que le rôle du plasma séminal dans la sélection des souches R5 restent à déterminer.

Divers modes de transmission hétérosexuelle de HIV à travers les muqueuses génitales féminines, impliquant le virus libre ou associé aux cellules, ont été décrits. Parmi ceux-ci, deux modes de passage de virus libre ou associé aux cellules à travers la muqueuse épithéliale génitale féminine ont particulièrement retenu notre attention : 1) la transcytose, qui implique la traversée du virus libre à travers les cellules épithéliales génitales sans induire d'infection ; 2) la transmigration, qui

implique le passage de NSMC infectées à travers les couches de cellules épithéliales génitales féminines. Ces modes de transmission semblent importants dans la transmission hétérosexuelle de HIV *in vivo*, mais leurs mécanismes ne sont pas complètement élucidés.

Diverses méthodes de visualisation du virus ont été développées durant les 3 dernières décennies. La méthode la plus largement utilisée à l'heure actuelle est la microscopie électronique, qui permet de visualiser le virus et sa structure. Cette technique microscopique nécessite de travailler sur des coupes fixées et ne permet donc pas de visualiser les mécanismes impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV. Des structures virologiques fluorescentes, tels que des pseudovirus exprimant une protéine de fusion fluorescente, ont été fabriquées afin de visualiser par microscopie à fluorescence la transmission hétérosexuelle de HIV. La plupart de ces pseudovirus expriment leur protéine de fusion fluorescente au cours d'un cycle de réplication, ce qui réduit les champs d'application et d'utilisation de ces outils pour l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV.

Les mécanismes régissant la transmission hétérosexuelle de HIV et la sélection R5 posent de nombreuses questions auxquelles nous essayons de répondre dans ce manuscrit. Les réponses apportées reposent principalement sur le développement d'outils virologiques et l'utilisation de techniques de visualisation pertinentes pour l'étude de la transmission de HIV libre ou associé aux cellules à travers la muqueuse génitale féminine, en fonction du tropisme du virus.

# DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

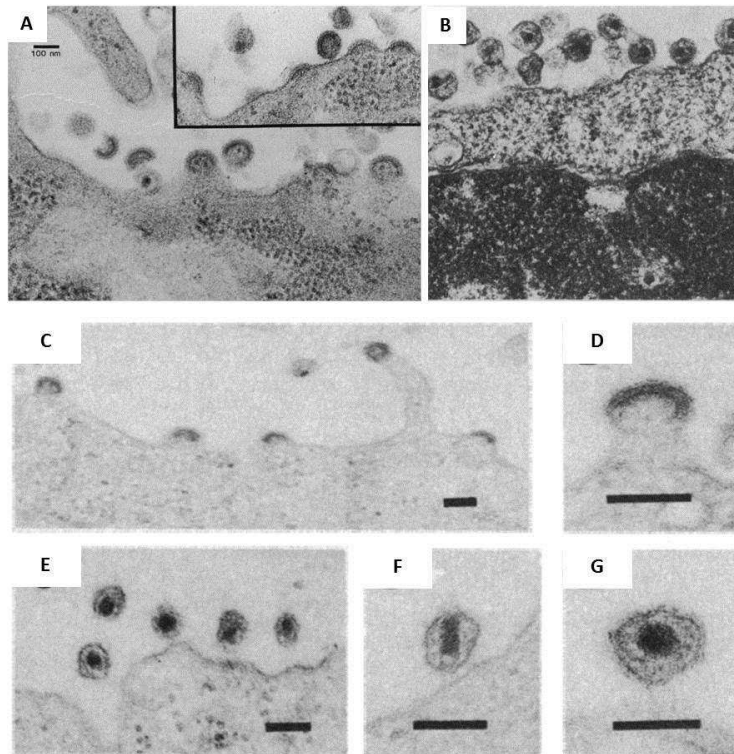
# Introduction

## I. Historique

A partir des années 1980, plusieurs cas d'un syndrome révélant une immunodéficience (dépression immunitaire, notamment au niveau des lymphocytes T CD4+, LT CD4) sont apparus chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes [1]. La communauté scientifique a rapidement identifié la cause de cette maladie comme étant un virus qui s'est par la suite avéré transmissible par voie sanguine et sexuelle [1]. Les premières recommandations de prévention, principalement en limitant le nombre de partenaires sexuels et en bloquant le don de sang quand une personne était « à risque », ont été publiées en mars 1983, avant même la découverte de l'agent responsable de ce syndrome [1].

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) a été isolé pour la première fois en 1983, par l'équipe de Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi (Figure 1-A), qui obtinrent le prix Nobel de médecine en 2008 pour cette découverte [2]. Le virus a été isolé à partir d'un prélèvement de ganglion lymphatique provenant d'un patient homosexuel atteint de lymphadénopathies multiples, pathologie caractéristique des patients en stade pré-SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise), par culture sur LT CD4 d'un donneur sain, et sur du sang de cordon ombilical de nourrisson [2]. C'est pourquoi il a été nommé « Lymphadenopathy Associated Virus » (LAV) par l'équipe de Luc Montagnier [3] sans pour autant que le lien entre LAV et SIDA ne soit établi, en 1984, l'équipe de Robert Gallo isole un virus considéré comme étant l'agent responsable du SIDA ; ce virus est nommé HTLV-3 (Human T-lymphotropic virus 3) (Figure 1-B) [4]. Au même moment, l'équipe de Jay A. Levy à San Francisco isole également plusieurs rétrovirus qu'ils nomment ARV (AIDS-associated viruses) (Figure 1-C à G) [5]. Ces trois appellations cohabiteront jusqu'en 1986, date à laquelle leur sera consensuellement substitué, lors de la conférence de Paris, le nom de « virus de l'immunodéficience humaine » (HIV) [6,7].





**Figure 1: Visualisation par microscopie électronique à transmission de particules HIV-1**

D'après Barré-Sinoussi et al. [2] (A), Popovic et al. [4] (B) et Levy et al. [5] (C-G).

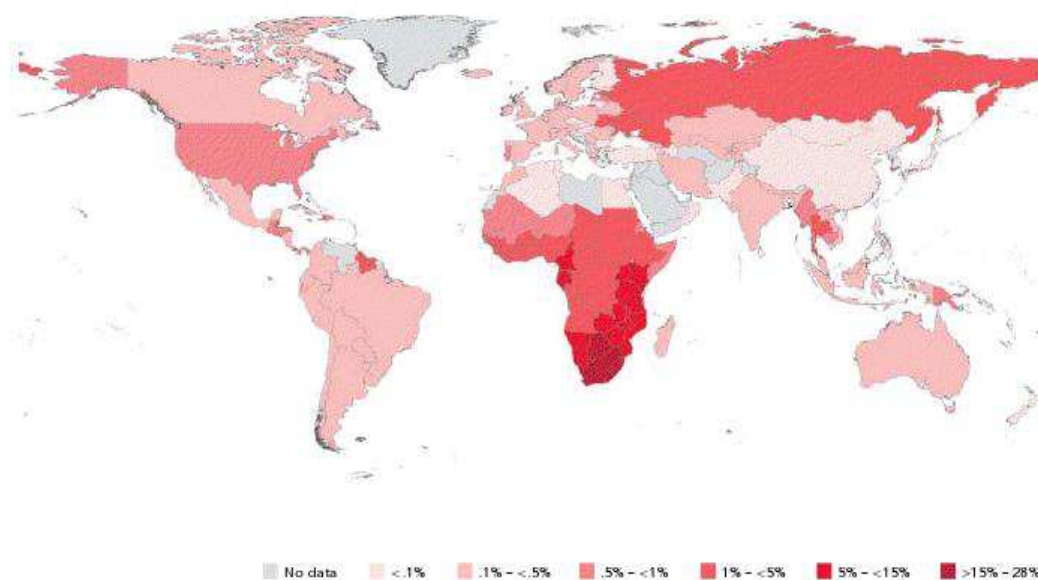
*Les virions sont produits par des lymphocytes (A-B) et des PBMC (C-G). A : L'encadré représente les étapes de bourgeonnement du virus à la surface de la cellule. C-D : Virus en cours de bourgeonnement. B, E-G : Virus libre extracellulaire. F : Virus immature. G : Virus mature.*

## II. Epidémiologie

La pandémie HIV se classe d'ores et déjà parmi les fléaux microbiens les plus dévastateurs de l'humanité. Environ 90% des nouvelles infections se produisent dans les pays en voie de développement, principalement pour des raisons d'hygiène et de manque d'accès aux traitements préventifs [1,8].

Deux types de virus HIV ont été décrits: HIV-1, probablement dévié d'un virus du chimpanzé, et HIV-2, probablement dévié d'un virus du sooty mangabey [1,7]. HIV-1 est le plus répandu, il est responsable de la pandémie actuelle. HIV-2, moins contagieux que HIV-1, est concentré en Afrique et est responsable de la majorité des infections en Afrique occidentale [1,3]. Chaque type de HIV est lui-même subdivisé en groupes et clades qui seront détaillés dans le chapitre « variabilité génétique ».

Depuis sa découverte, plus de 65 millions de personnes ont déjà été infectées par HIV [8,9], provoquant plus de 30 millions de morts [1]. En 2009, entre 2,3 et 2,8 millions de personnes ont été nouvellement infectées et 1,8 millions de personnes meurent chaque année du SIDA [10]. Sur les 34 millions de personnes vivant actuellement avec HIV, plus de la moitié sont des femmes [10,11]. L'épidémie semble avoir débuté en Afrique centrale, mais elle est actuellement majoritairement prévalente au sud de l'Afrique, puisque 1/6<sup>ème</sup> de l'épidémie mondiale est localisée dans cette région [1]. Plusieurs facteurs peuvent influencer cette tendance, notamment l'absence de circoncision, les coïnfections ou encore des facteurs sociaux tels que la précocité des premiers rapports sexuels chez les jeunes filles [1].



**Figure 2: Distribution de la prévalence de la répartition de HIV à l'échelle régionale chez les adultes en 2009.**

Source : <http://www.unaids.org>

HIV peut-être principalement transmis par deux voies: la voie sanguine (produits sanguins contaminés, seringues, etc.) [1,11,12] (1982. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, MC Poon et al. *ibid.* p.644.) et la voie sexuelle, qui représente 80% des infections [1,9,11-13] (Marmor et al. 1982. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*).

La transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme est la cause majoritaire des nouvelles infections (environ 60% en Afrique) et implique l'exposition des muqueuses génitales féminines aux sécrétions séminales de l'homme infecté [14]. Le risque de transmission de HIV par cette voie est estimé à 1/200 à 1/2000 événements d'exposition non protégée, et on compte actuellement environ 3500 femmes nouvellement infectées par jour (Tableau 1) [15,16]. Ce mode de transmission représente 30 à 40% des infections par HIV [15]. Il est 8 fois plus élevé que la transmission hétérosexuelle de la femme vers l'homme, selon une étude effectuée en Californie par l'équipe de N. Padian en 1997 [17].

**Tableau 1: Contribution des sites d'invasion de HIV à la pandémie.**

Site d'invasion de HIV	Localisation anatomique	Vecteur de transmission	Probabilité de transmission par exposition	Estimation de la contribution au nombre de cas HIV dans le monde
<b>Tractus génital féminin</b>	Vagin, Exocol, Endocol	Sperme	1/200-1/2000	12,6 millions
	Prépuce interne	Sécrétions et desquamation cervico-vaginales et rectales	1/700-1/3000	10,2 millions
	Urètre pénien			
<b>Tractus génital masculin</b>				
	Rectum	Sperme	1/20-1/300	3,9 millions
	Autre			1,5 millions
<b>Placenta</b>	villosités choriales	Sang maternel	1/10-1/20	480000
<b>Sang</b>		Produits sanguins, coupure	95/100-1/150	2,6 millions

Adapté de Hladik et al. [15].

La transmission hétérosexuelle de la femme vers l'homme est la deuxième cause d'infection par HIV. Il a été démontré que la circoncision protège en grande partie l'homme de l'infection par HIV (environ 60% des cas protégés de l'infection), mais exclusivement dans le cadre d'une transmission hétérosexuelle [11,18,19].

### III. De l'infection HIV au SIDA

La contamination par HIV, l'établissement de l'infection et l'évolution de la maladie vers le stade SIDA peut prendre jusqu'à plusieurs années, avec une variabilité temporelle importante entre chaque étape [20–22].

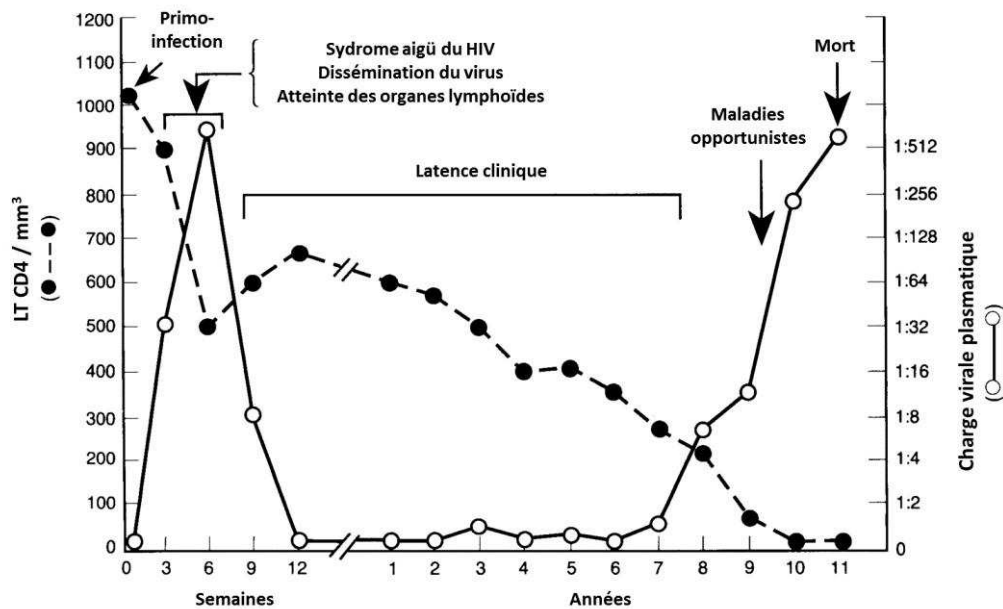
La première étape est la contamination, qui intervient jusqu'à 48h après exposition. Il existe des traitements antirétroviraux d'urgence permettant de diminuer fortement le risque de contamination après une exposition au virus. Lorsque le virus entre dans l'organisme, il va établir l'infection en se disséminant et s'installant au niveau des ganglions lymphatiques, qui sont le réservoir de cellules cibles de HIV. Jusqu'à ce stade, aucune méthode ne permet actuellement de détecter l'infection.

Lorsque le virus est entré en contact avec ses cellules cibles (principalement les LT CD4), notamment dans les organes lymphoïdes, il se réplique très rapidement en détruisant les cellules ou induisant leur mort. On observe donc à ce stade une forte baisse des LT CD4 (leur taux peut descendre jusqu'à moins de 200 cellules par  $\mu$ l de sang) et une forte augmentation de la charge virale plasmatique (pouvant atteindre plusieurs centaines de milliers de particules virales par ml de sang) (Figure 2). C'est la primo-infection, qui intervient 10 à 40 jours après exposition. A ce stade, le patient peut montrer des signes d'état grippal, de fièvre, de courbatures, provoqués par l'inflammation mise en place et la déplétion massive des LT CD4.

Après la phase aigüe de primo-infection, une phase chronique intervient, durant laquelle le système immunitaire est capable de se défendre face à l'infection virale. Cette phase est appelée phase de latence clinique ou phase asymptomatique (Figure 3). On observe durant cette phase une augmentation du nombre de LT CD4 dans le sang, ainsi qu'une baisse de la charge virale. On peut détecter la présence d'anticorps anti-HIV dans le sang. Cette phase chronique peut durer plusieurs années. L'administration d'un traitement antirétroviral peut stabiliser l'évolution de l'infection en maintenant un nombre de LT CD4 minimal (supérieur à 350 cellules par  $\mu$ l) dans le sang, ainsi qu'une charge virale indétectable (inférieure à 40 copies par ml) et ainsi empêcher l'évolution vers le stade SIDA [23].

Le stade SIDA peut intervenir plus de 10 ans après la contamination, en fonction des patients et du variant viral contracté. Il se caractérise par la survenue d'infections opportunistes ou de pathologies cancéreuses, qui peuvent être améliorées par la prise d'un traitement antirétroviral ; ces phases aigües sont séparées par des phases de latence. A ce stade, la charge virale plasmatique peut

atteindre quelques millions de copies par ml, le nombre de LT CD4 chute et l'organisme devient incapable de se défendre (Figure 3). A ce stade la majorité des patients contractent des infections opportunistes qui, en l'absence de système immunitaire efficace, peuvent s'avérer fatales. Des manifestations neurologiques peuvent également apparaître si le virus traverse la barrière hémato-encéphalique et pénètre dans le cerveau. La prise régulière d'un traitement antirétroviral efficace permet d'éviter l'évolution de la maladie vers le stade SIDA. Au stade SIDA, la mise en place d'un traitement antirétroviral efficace permet en général de faire régresser les pathologies opportunistes et de prolonger la vie du patient.



**Figure 3:** Evolution des différents marqueurs impliqués dans l'infection HIV, en fonction de la phase de la maladie, en absence de traitement.

D'après Pantaléo et al. [20].

*Peu de temps après la primo-infection on observe une large dissémination du virus ainsi qu'une diminution du nombre de LT CD4 dans le sang. Une réponse immunitaire anti-HIV s'ensuit, entraînant une diminution de la virémie et favorisant l'établissement d'une longue phase de latence clinique. Le nombre de LT CD4 diminue au cours de années qui suivent jusqu'à atteindre un seuil critique au-dessous duquel se déclarent des infections opportunistes.*

# HIV

Le virus HIV est un *Lentivirus* appartenant à la famille des *Retroviridae*. Les *Lentivirus* sont des rétrovirus non oncogènes, infectant les LT CD4 de l'hôte et responsables de maladies chroniques, à évolution lente, caractérisées par une immunodéficience T [7,24]. La sous-famille des *Lentivirus* inclut des virus similaires au HIV, capables d'infecter d'autres mammifères, notamment les primates non humains (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) [7,25], les félins (Feline Immunodeficiency Virus, FIV) [7,25], les oiseaux (Avian Leukosis Virus, ALV) [25], les murins (Murine Leukemia Virus, MuLV) [25], les caprins (Caprine Arthritis Encephalitis Virus, CAEV) [25], les ovins (Visna-Maedi Virus, VMV) [7,25], les bovins (Bovine Immunodeficiency-like Virus, BIV) [24] et les équins (Equine Infectious Anaemia Virus, EIAV) [7,25,26]. L'existence de *Lentivirus* de la même sous-famille que HIV chez ces animaux en ont fait, malgré leurs profils pathogéniques très différents, de bons modèles d'étude de la pathogénicité de HIV et l'induction de la maladie SIDA (cf. « modèles d'études biologiques ») [7,24,25].

## I. Structure

### A. Morphologie du virus

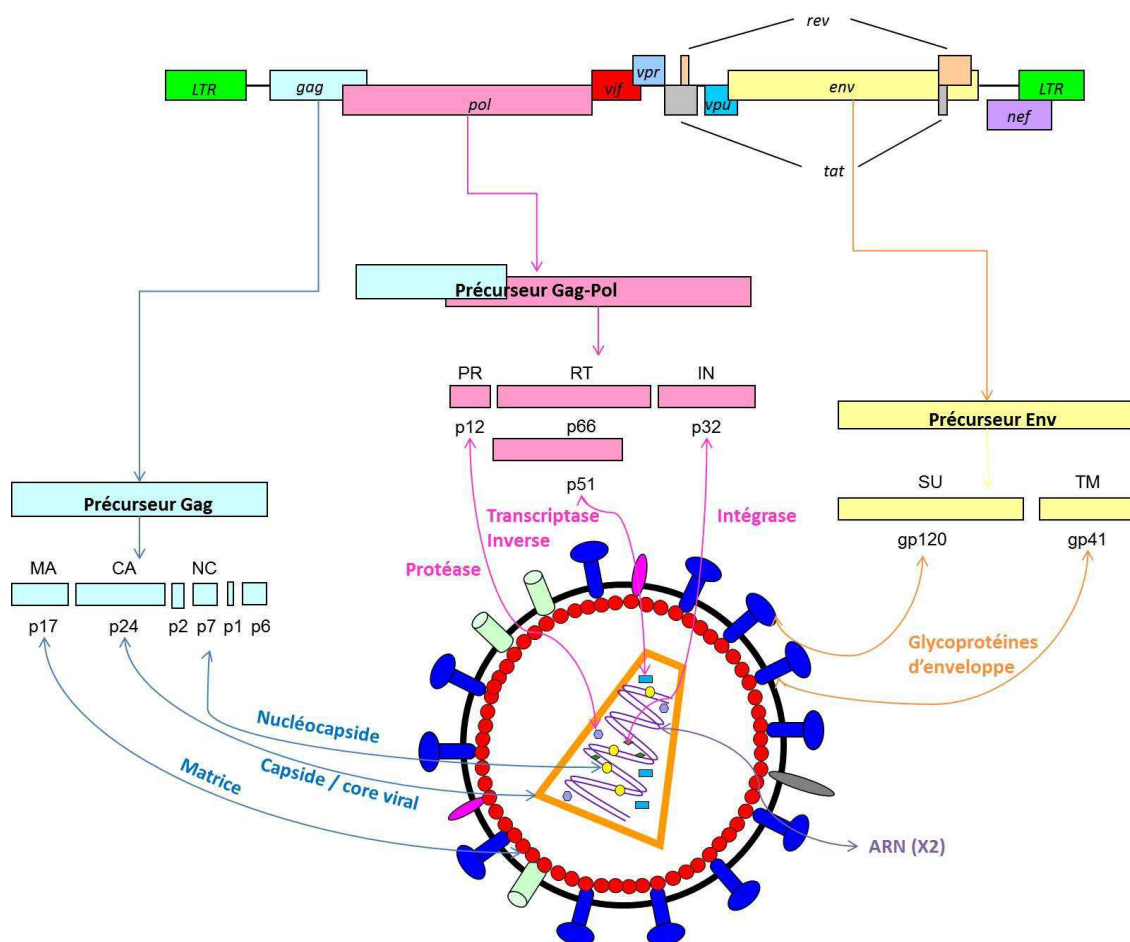
Les particules virales HIV matures sont sphériques (de 90 à 120 nm de diamètre) (Figure 4) et contiennent deux copies d'ARN viral simple brin positif [27]. L'ARN génomique viral est contenu dans une structure protéique particulière : le core viral. Ce dernier, constitué des molécules de Capside (CAp24 ou CA), contient les deux copies de l'ARN viral formant, avec la Nucléocapside (NCp7 ou NC), un complexe nucléoprotéique. Le core viral est lui-même enrobé dans une coque constituée de la protéine de Matrice (MAp17 ou MA), le tout étant enveloppé d'une bicouche lipidique issue de la cellule infectée et constituée de glycoprotéines d'enveloppe virale (gp120 et gp41) ainsi que de nombreuses protéines de la membrane cellulaire (Figure 4).

Le core viral présente une forme conique dans les virions matures (Figure 1-F, Figure 4), alors que, sous sa forme immature (juste après le bourgeonnement), le core viral a une forme sphérique (Figure 1-G) [26,27].

### B. Génome viral

Les rétrovirus sont des virus enveloppés contenant un génome ARN. Les rétrovirus complexes de la sous-famille des *Lentivirinae*, à laquelle appartient HIV, ont la particularité de comporter des gènes codant des protéines régulatrices en plus des gènes de structure (Figure 4) [7].

Le génome de HIV est composé de 2 brins positifs d'ARN monocaténaire, codant 15 protéines virales [28]. Lors de la réplication du virus, l'ARN va être rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par une Polymérase virale particulière : la Transcriptase Inverse. Le génome de HIV est long d'environ 9,2kb et se compose de trois gènes majeurs (contrairement aux autres *Lentivirus* qui peuvent contenir dans leur génome 4 gènes de structure) : le gène *gag* (*group-specific antigen*) qui code la polyprotéine de structure Pr55Gag constituée des domaines de la Matrice (Map17), la Capside (Cap24), la Nucléocapside (NCp7) et la protéine p6 ; le gène *pol* (polymérase) qui code les enzymes virales (Protéase (PR), Transcriptase Inverse (RT ou TI) et Intégrase (IN)) et le gène *env* codant la glycoprotéine d'enveloppe gp160 formée de 2 sous-unités : la glycoprotéine de surface: SUgp120 ou gp120 et la glycoprotéine transmembranaire: TMgp41 ou gp41 (Figure 4) [7,28].



**Figure 4:** Présentation schématique du génome, des précurseurs protéiques et de protéines codées par HIV-1 ainsi que de la structure de la particule virale.



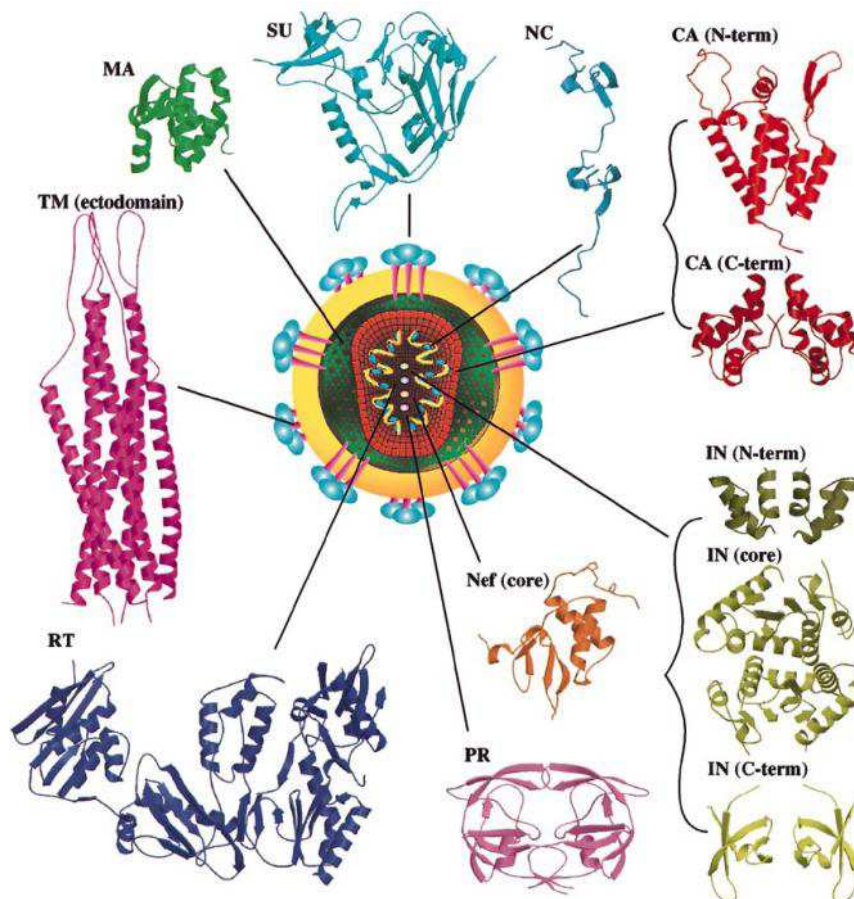
Sous la forme d'ADN proviral, ces gènes sont « encadrés » à chaque extrémité du génome par de longues séquences terminales répétées (LTR pour Long Terminal Repeat) contenant les régions promotrices (Figure 4) [24,28]. Le génome de HIV code également des protéines régulatrices : *Trans*-activator of transcription (Tat), Regulator of viral expression (Rev), Negative factor (Nef), Virion infectivity factor (Vif), Viral protein unknown (Vpu) et Viral protein regulatory (Vpr). A noter que HIV-2 n'exprime pas la protéine Vpu mais les protéines Vpr et la protéine Vpx qui sont génétiquement reliées, contrairement à HIV-1 qui ne code que la protéine Vpr [28,29]. Ces protéines sont impliquées dans les étapes précoces et/ou tardives du cycle de réplication de HIV-1 qui seront décrites plus loin.

Au cours de la réplication, l'ADN proviral est transcrit en ARNm viral, puis subit un épissage alternatif avant d'être exporté du noyau vers le cytoplasme pour être traduit. En effet, l'ARNm viral transcrit peut être non épissé (génome viral codant les protéines de structure Gag et Gag-Pol), mono-épissé (code la protéine d'enveloppe Env et les protéines accessoires Vif, Vpu et Vpr) et poly-épissé (code les protéines Tat, Rev et Nef) [30].

### C. Protéines virales

Les ARNm viraux nouvellement transcrits puis épissés codent les protéines virales HIV. Il en existe 4 grandes catégories : les protéines de structure (CA, MA, NC, p6, p1 et p2) ; les enzymes virales (IN, PR, RT) ; les protéines d'enveloppe (SU et TM) et les protéines régulatrices (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu, Vpr) (Figures 4 et 5).





**Figure 5: Présentation schématique de la structure de la particule virale HIV-1 et des protéines virales qui la composent.**

*D'après Turner et al. [26].*

## 1. Protéines de structure

Les protéines de structure de HIV sont issues du clivage du précurseur polyprotéique Gag-Pol par la Protéase virale (PR), pendant ou peu de temps après le bourgeonnement [31,32]. La polyprotéine Gag-Pol est synthétisée à partir d'un ARNm non épissé (génomique) dans le cytoplasme [33]. Un décalage dans le cadre de lecture (-1) au moment de la traduction induit une petite quantité de précurseur Gag-Pol (5-10%) au niveau de la membrane cellulaire, ce qui permet de guider l'assemblage des protéines virales [28]. Le précurseur polyprotéique Gag de 55kDa (Pr55Gag) est clivé par la PR en protéines Gag matures : la protéine de Matrice (MAp17 ou MA), la Nucléocapside (NCp7 ou NC), la protéine de Capside (Cap24 ou CA), la protéine p6 et deux petits peptides « espaceurs » : p1 et p2 [31]. Il contient également 3 domaines fonctionnels qui interviennent dans les étapes tardives du cycle de réplication de HIV : le domaine M en N-terminal de la Matrice (fixation

à la membrane), le domaine I dans la Nucléocapside (gère les interactions Gag-Gag) et le domaine L localisé dans la protéine p6 (gère le bourgeonnement et la maturation du virion) [33].

Le domaine MA myristoylé en N-ter du précurseur Pr55Gag permet l'accrochage direct à la membrane cellulaire des précurseurs Gag et Gag-Pol et interagit avec la queue cytoplasmique de la sous-unité transmembranaire de la protéine d'Enveloppe : gp41, pour incorporer les glycoprotéines d'enveloppe dans le virion naissant [26,28,31]. La protéine de Matrice mature reste associée à la face interne de la membrane virale au cours du clivage et de la formation du virion [28,31]. Cette protéine joue un rôle dans les événements précoces suivant l'entrée dans la cellule, l'import nucléaire du PIC, le ciblage des protéines virales et leur assemblage à la membrane plasmique [31,34]. Elle semble également faciliter l'infection de cellules qui ne se divisent pas, telles que les macrophages [28].

La Nucléocapside, p7, est une protéine virale hautement basique de 55 acides aminés, issue du clivage du précurseur PR55Gag lors de la maturation. Capable d'interagir avec les acides nucléiques elle enrobe l'ARN génomique viral [35,36]. Après la protéolyse, elle forme un complexe ribonucléoprotéique avec l'ARN génomique viral, initie la transcription inverse, facilite l'élongation et stabilise l'ADN proviral et le complexe de pré-intégration (PIC), elle assiste également l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte [26,31,35]. Elle se lie spécifiquement à la séquence signal d'encapsidation de l'ARN génomique dans le virion bourgeonnant (séquence  $\psi$ ) et est indispensable pour l'assemblage, la formation du virion et la stabilisation de l'ARN génomique [28,35]. Dans les étapes tardives du cycle de réplication, ce complexe nucléoprotéique intervient dans la reconnaissance et l'encapsidation du génome viral lors de l'assemblage et du bourgeonnement des nouveaux virions [31,36].

La protéine de Capside, p24, se condense au cours du processing du précurseur Gag, et entoure le complexe nucléoprotéique NCp7/ARN génomique pour former le core viral (environ 2000 molécules par virion) [28,31]. Via son domaine N-terminal, nommé domaine « core », la CA est impliquée dans l'étape de décapsidation via sa liaison avec la protéine cellulaire CypA (Cyclophiline A), qui est embarquée dans le virion bourgeonnant [31,36]. Le rôle de cette protéine cellulaire dans l'infection et le cycle de réplication viral est encore mal connu, mais elle semble être importante dans les étapes précoces de réplication du virus, ainsi que dans les étapes tardives d'assemblage et de bourgeonnement, notamment via sa partie C-terminale [26,28,31,36].

La protéine p6, composée de 51 acides aminés, est située sur l'extrémité C-terminale du précurseur polyprotéique Pr55Gag. Cette petite protéine virale est responsable du recrutement de facteurs cellulaires de l'hôte qui permettent l'établissement du bourgeonnement et du relargage des virions nouvellement formés. Elle semble notamment recruter la protéine Tsg101, une protéine

impliquée dans les mécanismes de tri endosomal et de délivrance de protéines cellulaires dans les MVB (Multi-Vesicular Body) (Figure 8) [33,37]. La protéine p6 gère également l'incorporation de la protéine Vpr dans les virions bourgeonnants et semble être impliquée dans la libération des virions naissants au niveau de certains types cellulaires, mais ce mécanisme est mal connu [31,33,38].

Le rôle des peptides p1 et p2, situés respectivement entre les domaines CA et NC, et NC et p6 sur le précurseur Pr55Gag, est également mal connu, mais ils semblent être impliqués dans le clivage de Pr55Gag lors de la maturation et dans l'incorporation de la CypA dans les nouveaux virions (p2) [28,31,39].

## 2. Enzymes virales

La Protéase, p12 (PR), est codée par le gène précurseur *gag-pol* (Figure 4), dont elle est par un mécanisme auto-catalytique dans les phases tardives de l'assemblage viral, du bourgeonnement ou après le relargage des virions [36]. La p12 ainsi activée joue un rôle primordial dans la maturation du virus en clivant les précurseurs Gag pour former p17, p24, p7, p6, p1 et p2, et le complexe Gag-Pol pour former IN, RT et PR (Figure 4) [27,28].

La Transcriptase Inverse, p51/66 (RT), est un hétérodimère formé des sous-unités p66 (560 acides aminés) et p51 (440 acides aminés) dérivées de la polyprotéine Pol [28]. Elle a pour rôle principal de catalyser la transcription inverse de l'ARN génomique viral en ADN double brin complémentaire proviral [35]. Cette rétro-transcription est réalisée au sein d'un complexe nucléoprotéique nommé « complexe de transcription inverse » (RTC) [35]. La transcription inverse intervient après entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule, et après ou pendant la décapsidation, même si le moment exact de cette action n'est pas encore connu (cf. « les étapes précoces du cycle de réplication ») [35,40].

L'Intégrase, p32 (IN), est une enzyme virale oligomérique de 32kDa (288 acides aminés par monomère), codée par le gène *gag-pol* (Figure 4). Elle est constituée de 3 domaines structuraux et fonctionnels séparés, dont un domaine N-ter qui facilite l'oligomérisation, un domaine core catalytique central et un domaine C-ter, moins conservé, qui se fixe à l'ADN [28,35]. Cette enzyme a pour fonction d'intégrer l'ADN proviral dans le génome cellulaire. Elle est un composant du PIC, joue un rôle dans son import nucléaire [34] et reconnaît les séquences LTR des ADN proviraux nouvellement synthétisés [26]. Elle semble interagir avec la transcriptase inverse afin de coordonner leurs fonctions [35].

### 3. Glycoprotéines d'enveloppe

L'enveloppe virale est une bicouche lipidique dérivée de la membrane cellulaire embarquée par le virus lors du bourgeonnement. Ainsi l'enveloppe virale contient des protéines cellulaires à leur surface, telles que des antigènes d'histocompatibilité ou de l'actine. L'enveloppe virale présente également à sa surface des glycoprotéines d'enveloppe virales, codées par le gène *env* du virus. Elle a un rôle primordial puisqu'elle détermine le tropisme viral et qu'elle est responsable de la fusion des membranes, ce qui explique qu'elle est la cible majeure des anticorps neutralisants produits par l'organisme.

La glycoprotéine d'enveloppe, gp160, est constituée de deux sous-unités, la partie extramembranaire gp120 est ancrée dans la membrane via la sous-unité transmembranaire gp41.



**Figure 6: Représentation schématique de la structure du précurseur d'enveloppe gp160, composée des protéines gp120 et gp41.**

D'après Klasse et al. [41].

*C1 à C5: domaines constants de gp120. V1 à V5 : domaines variables de gp120. FP: Peptide de fusion de gp41. NHR et CHR: domaines N terminal et C terminal du peptide de répétition (Heptade repeat) de gp41. MPER: domaine externe proche de la membrane (Membrane-Proximal External Region) de gp41. TM : domaine transmembranaire. CD : domaine cytoplasmique. Les fourchettes bleues représentent les sites de glycosylation.*

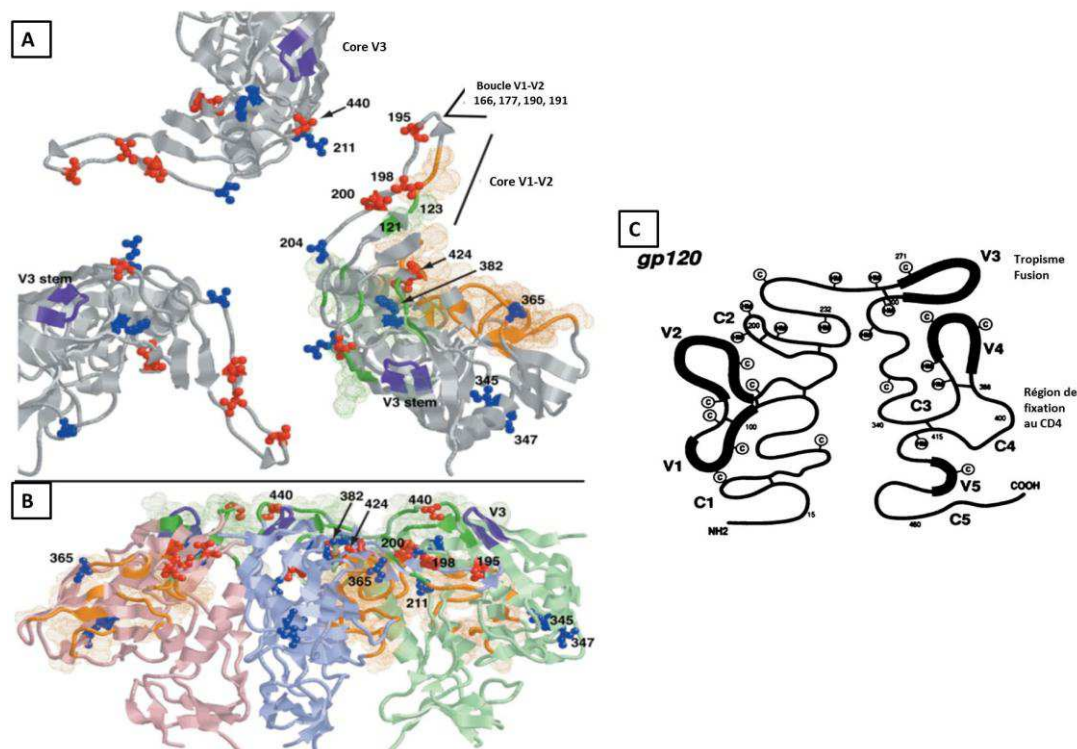
Le précurseur polyprotéique de gp160 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte où il semble s'oligomériser [31]. gp160 va alors être fortement glycosylée dans le RE et l'appareil de Golgi [26,42]. Cette protéine subit ensuite des modifications post-traductionnelles dans le RE et l'appareil de Golgi où elle est clivée pour produire ses deux sous-unités, gp120 et gp41. Celles-ci sont ensuite transportées au niveau de la membrane plasmique par les voies de sécrétion de la cellule hôte et incorporées sur la particule virale bourgeonnante [31]. Afin que l'enveloppe virale soit fonctionnelle, les deux sous-unités gp120 et gp41 doivent se coupler pour former un hétérodimère. Un trimère, métastable, de ces hétéro-dimères est incorporé lorsque le virus bourgeonne [41,42].

#### a. gp120

Il s'agit d'une glycoprotéine de 515 acides aminés, hautement glycosylée qui contient alternativement 5 régions hypervariables (V1 à V5) dont 4 régions forment des boucles exposées à la surface avec des ponts disulfure à leur base, et 5 régions moins variables (C1 à C5) (Figure 7) [26,43,44]. Plus de la moitié des sucres composant gp120 sont des mannoses hautement glycosylés situés aux extrémités de la glycoprotéine (Figure 7 C). Ce profil confère à HIV une forte hétérogénéité [45,46]. La séquence de gp120, codée par le gène env, varie rapidement après infection, plus particulièrement au niveau des régions hypervariables V1 à V5, ce qui constitue une des principales raisons de l'échappement du virus à la réponse immunitaire [26,44,45]. Les régions V2 et V3 de gp120 sont des régions cibles pour les anticorps neutralisants produits par l'organisme après infection.

Au-delà de son implication dans la sensibilité à la neutralisation, la région V3 est impliquée dans le processus de fusion ainsi que dans le tropisme cellulaire. Les régions constantes C1, C3, C4 et C5 permettent la liaison de gp120 avec gp41. La région constante C4 permet également la liaison de gp120 à CD4 (Figure 7 C) [42,47]. L'attachement du trimère de gp120 (Figure 7 A-B) à CD4 induit un changement de conformation dans gp120 qui induit l'interaction avec les récepteurs aux chimiokines (corécepteurs de HIV). Cette fixation avec les corécepteurs engendre un changement supplémentaire de conformation de gp120 qui va elle-même induire un changement de conformation de gp41, permettant la fusion des membranes cellulaires et virales [26,45,48].

gp120 est également capable de se lier à des récepteurs alternatifs, des glycosphingolipides, par son deuxième domaine conservé, C2 (aa 206-275) [13].



**Figure 7: Représentations schématiques de la structure de gp120.**

D'après Hoffman et al. [49] (A-B) et Geleziunas et al. [42] (C).

A-B : Structure des différents domaines structuraux et fonctionnels de gp120, la structure de la boucle V1-V2 n'est pas résolue sur cette représentation. (A) Trimère vu de la cellule cible. (B) Vue perpendiculaire du trimère par rapport au plan de la membrane virale, le site de liaison aux corécepteurs est orienté vers le haut. Les nombres représentent les positions d'acides aminés. Les lettres C et V suivies d'un chiffre représentent respectivement les régions constantes et variables de gp120. Vert : sites de liaison au corécepteur CCR5. Orange : Sites de liaison au récepteur CD4. La boucle V3 est représentée en violet. C : Structure du trimère de gp120 détaillant la localisation des résidus importants pour la détermination du tropisme viral. Les lettres C et HM encadrées représentent respectivement les N-glycosylations et les N-glycosylations hautement mannosylées.

#### b. gp41

La sous-unité transmembranaire de la glycoprotéine d'enveloppe, gp41, dont la structure native est encore inconnue, est constituée de 344-345 acides aminés et est moins riche en sucres que gp120 [50,51]. Les motifs fonctionnels de gp41 sont cependant bien étudiés ; cette sous-unité de gp160 est constituée d'un ecto-domaine transmembranaire en N-ter (ECTO) et d'un segment intraviral C-ter (queue cytoplasmique) qui interagit avec p17 [26]. Ainsi, les 20 résidus situés en N-ter forment le peptide de fusion (FP) qui initie la fusion des membranes virales et cellulaires [28]. La

partie C-ter de ce peptide est constituée de 2 régions composant la partie N-ter et la partie C-ter d'un motif appelé « heptad repeats » (HR), NHR et CHR respectivement. Une boucle située entre ces deux structures permet la liaison avec gp120. Finalement, gp41 est terminée par une longue queue cytoplasmique qui module la conformation externe de l'enveloppe et sa capacité de fusion [41,51]. Au cours du processus de fusion, les sites de liaison aux anticorps neutralisants du NHR sont exposés et deviennent une cible accessible. Le domaine CHR, quant à lui, contient une région nommée MPER (Membrane-Proximal External Region) comportant également des sites de reconnaissance par les anticorps neutralisants. Cette région MPER joue un rôle important, avec le domaine transmembranaire, lors de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte [26,41].

Même si aucune structure précise de gp41 complète n'a pu être établie, des études structurales montrent que le core de gp41 forme un trimère dans sa configuration fonctionnelle, ce qui suggère que la protéine gp41 complète devrait former un trimère pour être fonctionnelle [28].

#### 4. Protéines accessoires et régulatrices

Au cours du temps, et en fonction des pressions immunitaires exercées sur HIV, ce virus a évolué afin d'échapper aux activités antivirales des protéines cellulaires. HIV exprime des protéines accessoires et régulatrices, généralement absentes chez d'autres rétrovirus, qui jouent un rôle clé dans la pathogénèse virale. Ces protéines lui permettent de contrecarrer l'activité des facteurs de restriction cellulaires impliqués dans la défense antivirale de l'hôte. En effet elles sont non seulement impliquées dans la modulation de l'environnement cellulaire dans les cellules infectées, mais elles favorisent également la réplication virale, la transmission du virus et son échappement face au système immunitaire.

##### a. Rev (Regulator of viral expression)

La protéine virale régulatrice Rev, également nommée p20, est une protéine régulatrice de 116 acides aminés localisée dans le noyau cellulaire où elle se lie à la région RRE (Rev Response Element) de la région env de l'ARNm génomique viral [26]. Elle contient un signal d'export nucléaire riche en leucine (NES) qui lui permet de circuler entre le noyau et le cytoplasme afin de jouer son rôle de transporteur des ARNm [28]. En effet Rev est requise pour le transport des ARNm viraux non épissés ou peu épissés du noyau vers le cytoplasme en agissant au niveau des pores nucléaires, et empêche l'épissage des ARNm viraux par la machinerie cellulaire [26,33]. En revanche elle n'est pas nécessaire pour l'export nucléaire des transcrits entièrement épissés, codant les protéines Tat, Rev et Nef. Cette protéine est une « protéine virale précoce » puisqu'elle est exprimée tôt dans le cycle de



réplication, avec les protéines Tat et Nef, contrairement aux protéines de structure et les autres protéines virales, codées par des transcrits tardifs [30].

b. Tat (*Trans*-activator of transcription)

Tat est une protéine régulatrice exprimée précocement dans le cycle de réplication virale, et relativement bien conservée puisqu'elle partage de fortes homologues avec les protéines Tat d'autres rétrovirus. Elle est composée de 80 à 103 acides aminés en fonction du variant viral, la majorité comportant 101 résidus [52]. Tat est constituée de 4 régions : un domaine riche en cystéine situé en N-ter, un core hydrophobique structuré d'environ 10 acides aminés, un segment basique, et un domaine riche en glutamine en position C-terminale de la protéine [26,28].

Tat est importée dans le noyau par des mécanismes encore mal définis qui relèveraient plutôt d'une diffusion passive [52]. Tat semble être exprimée par l'ADN proviral non intégré au génome cellulaire [53] et peut s'accumuler dans le noyau de la cellule infectée, en fonction du type cellulaire, pour y jouer le rôle de *trans*-activateur de la transcription et de la réplication de HIV. [26,52]. Tat est également capable de sous-réguler l'expression de molécules du CMH-I à la surface des cellules infectées en agissant au niveau transcriptionnel. De plus, elle bloque par compétition la transcription du CMH-II, permettant ainsi au virus d'échapper au système immunitaire [40].

c. Nef (*HIV* Negative factor)

Nef est une protéine accessoire virale de 206 acides aminés et 27kDa myristoylée en position N-terminale, fortement exprimée dans la cellule hôte peu de temps après l'infection par HIV [26]. Son transcrit est généré par l'ADN proviral non intégré. Le gène *nef* est très conservé entre les différentes lignées des *Lentivirus* de primates [54]. La protéine Nef joue un rôle important dans l'augmentation de l'infectivité du virion, la stimulation de la réplication virale, le maintien de l'infection virale dans l'organisme et l'évolution vers le stade SIDA. Elle semble améliorer l'infectivité du virus en augmentant la synthèse et l'incorporation de cholestérol dans les nouveaux virions produits, en facilitant le transport du génome viral via le réseau d'actine corticale, ou encore en réduisant la dégradation des particules virales par le protéasome [26,53,54]. Nef est elle-même incorporée dans le virion bourgeonnant à raison d'environ 70 molécules par virion [28]. Elle stimule la réduction du nombre de récepteur CD4 à la surface des cellules, par un mécanisme d'endocytose et de dégradation [26,40,42] et « sous-régule » l'expression du CD28 (co-stimulateur de l'activation des LT) et du CMH-I, ce qui diminue la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire [28,40,54]. De plus, Nef semble augmenter la capacité de retro-transcription du génome



viral et son infectivité, en agissant au niveau d'étapes précoces du cycle de réplication virale, notamment au niveau de la décapsidation, selon un mécanisme encore mal défini [55].

La protéine Nef provenant de HIV-2 et la majorité des SIV est capable de « sous-réguler » l'expression du récepteur CD3, essentiel à l'établissement du récepteur aux LT (TCR). En revanche, la protéine Nef provenant de HIV-1 et de SIVcpz (SIV du chimpanzé), n'ont pas cette fonction de « sous-régulation » du récepteur CD3 [54].

#### d. Vif (Virion infectivity factor)

Vif est une protéine de 192 acides aminés et 23 kDa. Elle est riche en acides aminés basiques et en acides aminés hydrophobes [28]. Incorporée dans les nouveaux virions (7 à 100 molécules par virion), elle est indispensable à l'infectivité et à la réplication de HIV dans certains types cellulaires (lymphocytes et macrophages notamment). Vif intervient dans les étapes précoces de réplication, mais aussi dans les étapes d'assemblage et de maturation. En effet, les virus défectifs pour Vif ne peuvent pas compléter leur synthèse d'ADN proviral, et les complexes de rétro-transcription (RTC) sont moins stables que ceux de virus sauvages. De plus, s'ils ont la même composition en protéines et ARN que les virus sauvages, la structure du core est altérée [28,56]. Vif semble fonctionner en interagissant préférentiellement avec des protéines cellulaires, et non avec des composants viraux [26]. En effet, il a été montré qu'elle agit en bloquant l'activité antivirale de la protéine cellulaire APOBEC3G qui inhibe la réplication virale en agissant au niveau de la transcription inverse (Figure 8) [56].

#### e. Vpr (Viral protein regulatory)

Vpr est une petite protéine basique de 96 acides aminés (14 kDa) bien conservée, comportant un cœur hydrophobe capable de former des oligomères lui permettant de former un complexe avec Pr55Gag [57]. Cette protéine joue un rôle pivot dans la pathogénèse virale, notamment dans l'induction de l'apoptose cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, et la *trans*-activation du LTR [57,58]. Vpr semble également jouer un rôle dans l'import nucléaire du PIC en le connectant à la machinerie d'import nucléaire des cellules, en division ou non (e.g. macrophages), permettant ainsi l'établissement d'un réservoir viral qui contribue à l'expansion du virus dans l'organisme [28,29,34]. Vpr est importante puisqu'elle est incorporée dans le virion naissant via son interaction avec p6. En effet, Après les étapes d'assemblage et de clivage du précurseur Pr55Gag, Vpr interagit avec cette protéine de structure et est délocalisée vers la membrane plasmique où elle va être recrutée à l'intérieur du core viral (environ 275 molécules par virion) et s'associer au génome ARN viral ainsi qu'à la protéine p7 [28,29,57].

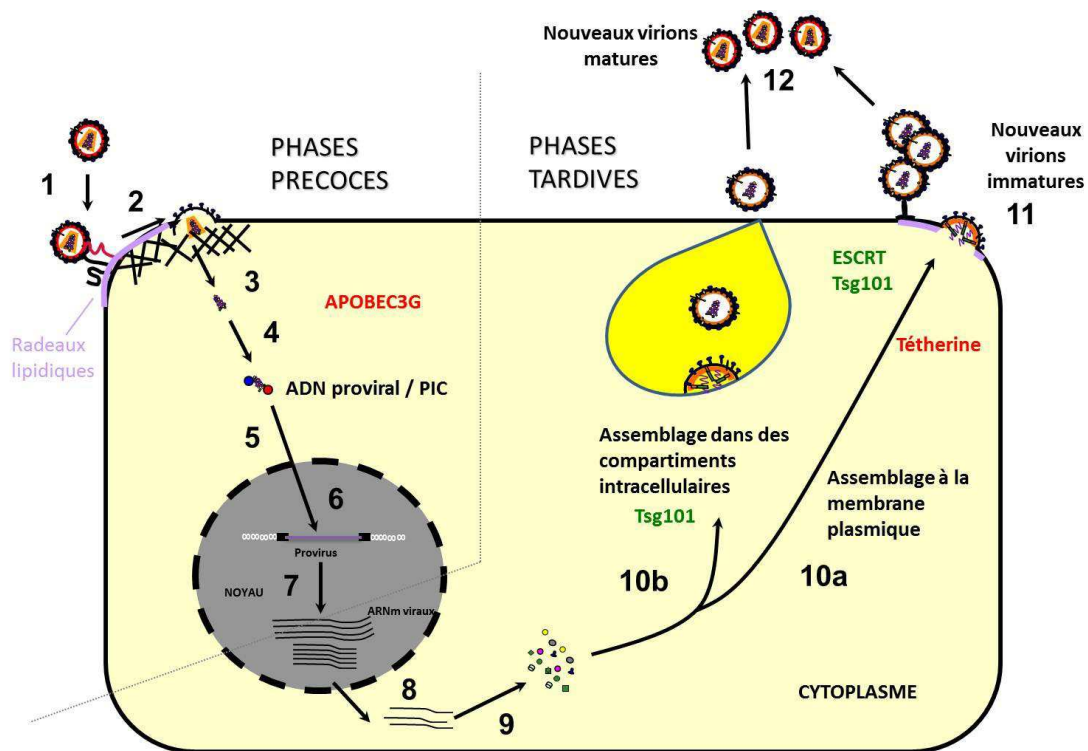
#### f. Vpu (Viral protein unknown)

Vpu, également appelée p16, est une protéine accessoire de 77 à 86 acides aminés et 16kDa, exprimée par HIV-1 et certaines souches de SIV mais absente chez HIV-2. Elle est exprimée tardivement dans le cycle de réplication de HIV et est capable de s'associer à la membrane pour former des homo-oligomères. Cette protéine accessoire confère à HIV-1 un réel avantage réplcatif et infectieux. En effet, Vpu joue un double rôle dans le cycle de réplication virale, en fonction du groupe auquel les variants viraux appartiennent. D'une part elle agit sur la sous-régulation de l'expression de CD4 en intervenant dans le RE où elle cible le récepteur CD4 et provoque sa dégradation via la voie protéasome-ubiquitine [59] ; ce mécanisme empêche la fixation de CD4 à la protéine d'enveloppe dans le RE, permettant ainsi le clivage complet de gp160 et sa translocation au niveau de la membrane cytoplasmique [26]. D'autre part, la protéine Vpu favorise la libération de virions nouvellement synthétisés en inhibant l'activité antivirale de la protéine cellulaire Tétherine, qui est un facteur de restriction exprimé par certaines cellules hôtes inhibant la libération des nouveaux virions après bourgeonnement [28,59]. Ces deux fonctions sont présentes simultanément dans les virus du groupe M, le groupe pandémique, alors que seulement l'une ou l'autre d'entre elles est observée chez les virus des groupes N et O. Cela pourrait expliquer en partie le fait que le groupe M soit le variant viral responsable de la pandémie actuelle. Les données, relatives à Vpu, concernant le groupe P, récemment identifié, ne sont pas encore connues [59].

Plusieurs études sont en cours afin de déterminer d'autres fonctions de cette dans la pathogénèse de l'infection par HIV-1 [28,59].

## **I. Cycle de réplication**

Le cycle de réplication virale de HIV est communément et arbitrairement divisé en deux parties : les phases précoces et les phases tardives de réplication (Figure 8). Les phases précoces comprennent toutes les étapes de réplication virale de l'entrée du virus dans la cellule jusqu'à l'intégration du génome viral rétro-transcrit dans le génome cellulaire. Les phases tardives quant à elles comprennent toutes les étapes depuis de la transcription du génome proviral intégré (provirus) jusqu'au bourgeonnement du nouveau virion produit et sa maturation (Figure 8).



**Figure 8: Cycle de réplication de HIV**

**(1-6) Etapes précoces :** 1) liaison des glycoprotéines de l'enveloppe virale sur les récepteurs et corécepteurs de la cellule cible. 2) Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. 3) Entrée et libération du core viral dans le cytosol. 4) Trafic du complexe de transcription inverse (RTC) et transcription inverse de l'ARN viral en ADN proviral. 5) Formation du complexe de pré-intégration (PIC) et import nucléaire. 6) Intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte. **(7-12) Etapes tardives :** 7) Transcription du provirus intégré en ARNm viral par l'ARN polymérase II cellulaire. 8) Epissage alternatif des ARN viraux et export du noyau vers le cytoplasme. 9) Traduction de l'ARNm viral épissé en protéines virales. 10) Assemblage des virions (10a) majoritairement à la membrane plasmique au niveau de micro-domaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides (radeaux lipidiques) ; ou (10b) assemblage au niveau de compartiments intracellulaires présentant, pour certains, les caractéristiques structurales des endosomes tardifs. 11) Bourgeonnement et libération des particules virales. 12) Maturation des particules virales immatures. (Vert) protéines cellulaires ayant un effet activateur sur la réplication de HIV-1. (Rouge) Protéines cellulaires ayant un effet inhibiteur sur la réplication de HIV-1.

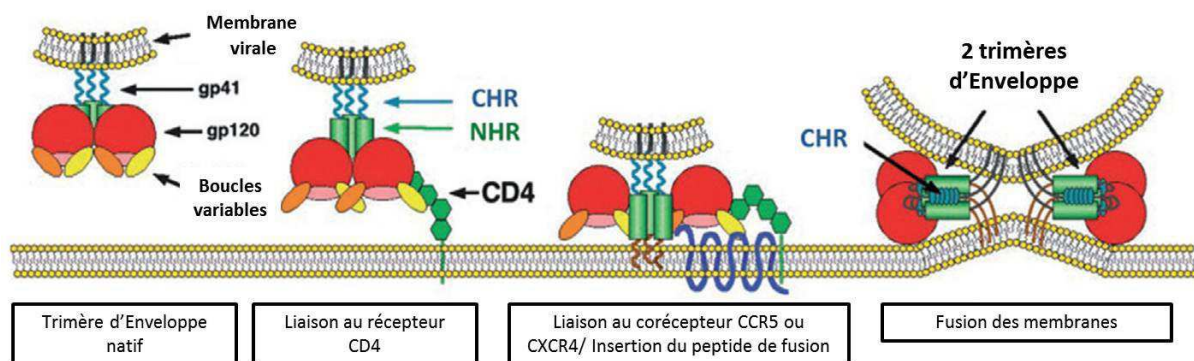
## A. Etapes précoces

### 1. Entrée

Lors d'une infection, l'entrée d'un rétrovirus dans la cellule cible se fait via de multiples étapes. La première étape est l'attachement du virus à la cellule cible (Figure 8).

#### a. Attachement et fusion

Lors de la première étape du cycle de réplication virale, la protéine gp120 reconnaît le récepteur cible cellulaire principal, CD4, et se fixe sur celui-ci [31,56]. Cette interaction induit l'ancrage du virus sur la cellule et un changement de conformation au niveau des deux protéines impliquées : gp120 et CD4 [56]. Suite à cela, les corécepteurs principaux de HIV (récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5) sont recrutés au niveau des radeaux lipidiques membranaires et vont aider à l'entrée du virus en permettant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Figures 8-1 et 9) [31,56]. Les corécepteurs ainsi recrutés fixent ensuite gp120, ce qui entraîne un nouveau changement de sa conformation [56], et son détachement de la protéine gp41 [56]. gp41 va ainsi se trouver dans une conformation « fusogénique » : le peptide de fusion de gp41 s'ancrage alors dans la membrane cellulaire, ce qui permet la fusion des membranes et ainsi le relargage du core viral dans le cytoplasme de la cellule cible (Figures 8-2/3 et 9) [31,56].



**Figure 9: Représentation schématique des étapes d'attachement et de fusion des membranes.**

D'après Klasse et al. [41].

De nombreuses études montrent que les radeaux lipidiques sont impliqués dans le processus d'entrée du virus [56]. En effet, il a été montré que, lors des phases d'entrée du virus dans la cellule, il y a une interaction directe entre gp120 et certains glycosphingolipides au niveau de micro-domaines membranaires [56]. Cependant, la contribution des radeaux lipidiques à l'entrée du virus dans la cellule reste encore mal connue [56].

Il existe plusieurs voies d'entrées de HIV dans la cellule, celui-ci pouvant entrer via des récepteurs alternatifs par un mécanisme différent de la fusion. En effet il a été démontré que le virus

peut entrer dans la cellule par endocytose après fixation, ce qui induit une infection non productive de la cellule et dépend de la cellule infectée [56,60]. De plus, chez les *Lentivirus*, un mode d'infection direct par contact cellule-cellule a été mis en évidence, notamment chez les cellules dendritiques (DC), qui sont capable de transmettre le virus aux LT par contact direct, via une synapse virologique, sans être elles-mêmes infectées [56].

#### b. Décapsidation et transcription inverse

Lorsque la membrane cellulaire a fusionné avec l'enveloppe virale, il y a injection du core viral dans le cytoplasme. Immédiatement après son relargage dans le cytoplasme, le core viral subit une étape appelée décapsidation (Figure 8-3). Les étapes de décapsidation et de transcription inverse sont encore mal définies [56]. Durant ces étapes, le core viral est progressivement et partiellement désassemblé. Cette étape donne lieu à deux « subparticules virales » appelées « complexe de transcription inverse » (RTC) qui va initier la transcription inverse, et PIC. Durant la décapsidation, il semblerait que la protéine de Capside soit en partie perdue, alors que plusieurs autres, notamment p7, IN, RT, Vpr et p, seraient retenues pour former un complexe de haut poids moléculaire, le PIC, qui va finaliser l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte (Figure 8-3/4) [31,35,61]. Même si les mécanismes impliqués sont mal connus, il semblerait que l'étape de transcription inverse du génome viral ait lieu au moment de la décapsidation, et que plusieurs protéines virales et cellulaires interviennent dans ces étapes complexes du cycle de réplication virale [29,31,40].

### 2. Import nucléaire

Lorsque le core viral est entré dans la cellule et que l'ARN viral génomique a été rétro-transcrit en ADN complémentaire proviral (ADNc), les *Lentivirus* ont besoin, pour se répliquer, d'intégrer leur génome viral dans le génome cellulaire (formation du provirus) [56]. Avant cette étape d'intégration, le génome viral rétro-transcrit associé au PIC va entrer dans le noyau de la cellule (Figure 8-5) ; selon un mécanisme encore mal connu. Participent à ce processus l'ADN proviral, les protéines virale IN, p17, p24 et Vpr, constitutives du PIC, ainsi que certaines protéines cellulaires [33,56]. Le PIC des *Lentivirus* tels que HIV sont capables d'entrer activement dans le noyau cellulaire, 4 à 6h *post*-infection, et de se répliquer même dans des cellules qui ne se divisent pas (e.g. les macrophages), notamment grâce à l'intervention de Vpr qui facilite l'import nucléaire de l'ADN proviral [29,56]. De plus, il a été montré que la protéine cellulaire LEDGF/p75 est requise pour l'import nucléaire de l'enzyme virale IN avec laquelle elle interagit directement, cette interaction étant spécifique chez les *Lentivirus* (et non chez les *Retrovirus*) [35].

### 3. Intégration

Une fois entré dans le noyau cellulaire, l'ADN proviral peut s'intégrer dans le génome cellulaire et former le provirus (Figure 8-6). Cette étape est rendue possible grâce à l'implication, de protéines virales, notamment IN et p7 [31,35]. Cette propriété dévolue aux *Retrovirus* permet le maintien d'un réservoir d'ADN proviral à long terme dans la cellule. C'est pourquoi les vecteurs rétroviraux sont intéressants, notamment en thérapie génique [56].

Malgré les nombreuses études menées sur l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire, les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont bien peu connus et assez controversés [62]. Les premières études sur l'intégration ont montré que l'insertion de l'ADN proviral se faisait de manière non spécifique sur la totalité du génome cellulaire [56]. En revanche, elle peut être influencée par la structure de la chromatine avoisinante. AR Schröder et coll. ont montré, par exemple, que le génome de HIV s'intégrait préférentiellement dans les gènes hautement transcrits par l'enzyme cellulaire RNA Pol II et les régions regroupant des gènes activés lors de l'infection par HIV [62]. Cela pourrait s'expliquer, entre autres, par le fait que, lorsque les gènes sont activés, la chromatine s'ouvre et devient accessible au génome de HIV qui peut s'intégrer. Une autre explication serait que les zones présentant des gènes activés promouvraient des interactions privilégiées entre le complexe de pré-intégration et des facteurs de transcriptions cellulaires locaux, comme cela a été décrit pour les rétro-transposons chez la levure [62].

On retrouve des provirus tout le long du génome cellulaire, indépendamment de la séquence du génome cellulaire [62] mais plus particulièrement au niveau de certaines régions, ce qui suggère que l'intégration de l'ADN proviral de HIV est influencée par des interactions spécifiques entre les protéines de l'hôte (e.g. LEDGF/p75) [35], et les composants viraux, ou par une architecture spécifique de la chromatine dans ces régions [56,62]. Le virus peut intégrer 1 à 5 copies de son génome par cellule. Plusieurs études ont montré que l'IN interagit avec certaines protéines mitotiques cellulaires, guidant ainsi le PIC vers certains sites d'intégration spécifiques [56]. D'autres études ont montré des interactions entre certaines protéines cellulaires, l'IN et la p17 [35,56]. Toutes ces études n'ont pourtant pas permis de rendre compte précisément des mécanismes impliqués dans le choix des sites d'intégration.

De façon alternative, l'ADN proviral peut également se circulariser dans le noyau cellulaire, et ne pas s'intégrer au génome cellulaire. Cet ADN non intégré existe sous trois formes : deux forme circulaires, 1-LTR circle et 2-LTR circle et une forme linéaire ; les deux formes circulaires étant directement issues de la forme linéaire.

## ***B. Etapes tardives***

Les étapes tardives de réplication de HIV commencent à la transcription de l'ADN proviral intégré, ou non, dans le génome cellulaire, et se termine avec la maturation des virions après bourgeonnement (Figure 8-7 à 8-12).

### **1. Transcription**

Lorsque l'ADN proviral est intégré au génome cellulaire, formant ainsi le provirus, la cellule le considère comme appartenant à son propre génome ; il est donc transcrit comme un gène cellulaire [31]. La transcription est initiée au niveau du promoteur de HIV-1 localisé dans la partie 5'LTR (Figure 4) [26]. Le seul facteur de transcription viral impliqué dans cette étape de transcription est la protéine virale Tat qui agit en association avec certains facteurs cellulaires [53]. L'action de Tat et la stimulation cellulaire sont deux éléments indispensables pour l'activation du promoteur LTR, et la transcription du génome viral. La transcription du provirus est réalisée par la polymérase cellulaire : RNA polymérase II (Figure 8-7) [53]. La transcription complète du provirus conduit à la production d'une trentaine de transcrits viraux différents qui dérivent directement d'un même transcrit ayant subi un épissage alternatif, générant ainsi différents ARNm [53]. Les différents transcrits générés peuvent être divisés en trois classes : les ARNm poly-épissés, qui codent les protéines régulatrices (Tat, Rev, Nef) ; les ARN mono-épissés, qui codent les protéines régulatrices (Vif, Vpu, Vpr) et la protéine d'enveloppe gp160 ; et les ARNm non épissés qui codent les protéines de structure, Gag-Pol, ou seront embarqués dans les particules virales bourgeonnantes comme ARN génomique (Figure 8-8) [53]. De plus, certains transcrits contenant des introns fonctionnels peuvent être exportés du noyau cellulaire grâce à l'activité de la protéine virale Rev, car ils sont nécessaires pour la synthèse et le « packaging » des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol [26,53]. La protéine Rev est ensuite de nouveau importée dans le noyau cellulaire [26].

Parallèlement à cela, l'ADN proviral non intégré au génome cellulaire peut être transcrit lors d'une étape précoce du cycle de réplication de HIV, et il a la capacité de synthétiser les trois classes de transcrits (poly-, mono- ou non-épissés). En revanche, seuls les transcrits codant les protéines régulatrices Tat, Rev et Nef sont traduits. Cette restriction de traduction pourrait être due au manque de fonctionnalité de Rev, en l'absence d'intégration [53].

Tous les ARNm viraux transcrits vont ensuite être exportés du noyau et traduits en protéines virales via la machinerie cellulaire classique de traduction (Figure 8-8/9).

## 2. Assemblage

Lorsque les protéines virales sont produites par la cellule, celles-ci vont s'assembler au niveau de la membrane plasmique (Figure 8-10a) [36]. L'assemblage des particules virales implique des interactions coopératives entre les différents domaines du précurseur polyprotéique Gag [31]. En effet, cette étape est initiée par le domaine MA du précurseur Pr55Gag et certains composants cellulaires tels que le phospholipide membranaire PI(4,5)P<sub>2</sub>, et guidée par la polyprotéine virale Gag [33,36]. Gag recrute d'autres composants viraux, tels que des protéines de réplication virale et l'ARN génomique non épissé, et les cible au niveau du site d'assemblage des virions [31,36]. Ces protéines virales sont donc cruciales pour l'assemblage. De nombreuses protéines virales (notamment RT, IN, Vpr et PR, recrutées par la protéine p24) [31,57] et cellulaires (notamment CypA (interaction avec Vpr), INI-1 (interaction avec IN) et Staufen-1 (interaction avec l'ARN génomique et Gag), qui semblent jouer un rôle dans le cycle de réplication de HIV-1) sont embarquées dans le virion bourgeonnant [29,35].

Plusieurs études ont montré que l'assemblage de Gag et le bourgeonnement de particules virales pouvaient également avoir lieu dans des compartiments intracellulaires (notamment des corps multi-vésiculaires (MVB) ou des endosomes tardifs (LE)), dans les macrophages, mais aussi dans d'autres cellules (Figure 8-10b) [33,57,63]. Différents modèles sont proposés pour expliquer ce phénomène. La première hypothèse suggère que Gag s'assemble à la membrane plasmique ou au niveau des MVB/LE en fonction du type cellulaire et de la nature du signal reçu [37]. Dans un deuxième modèle, il est suggéré que, dans toutes les cellules, Gag est d'abord ciblé au niveau des MVB/LE et est ensuite redirigé vers la membrane plasmique [63]. Enfin, un troisième modèle suggère que l'assemblage a lieu au niveau de la membrane plasmique, et donc que la présence de protéines virales dans des vésicules équivaldrait à une endocytose suivant un échec de bourgeonnement [33,57,64].

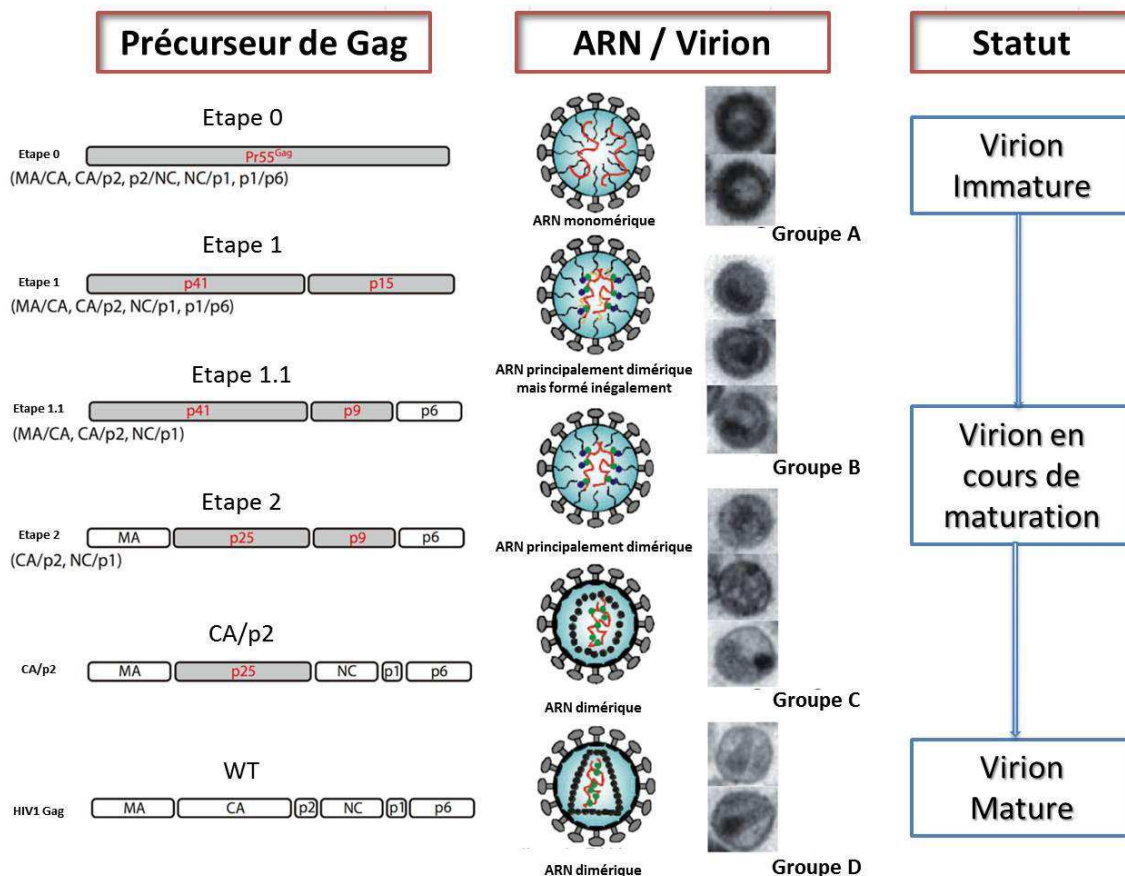
Il apparaît depuis quelques années qu'il existe dans la cellule plusieurs sous-populations de Gag, qui ont des destins et des fonctions différentes : assemblage, endocytose, dégradation par le protéasome. Plusieurs études doivent encore être menées afin de comprendre exactement le déroulement de cette étape tardive cruciale du cycle de réplication du virus, pour laquelle il n'existe pas encore de cible thérapeutique.

L'assemblage mène à l'enveloppement des composants viraux à la membrane et au bourgeonnement du virion immature, qui acquiert ainsi son enveloppe lipidique (Figure 8-11) [32,36].



### 3. Bourgeonnement et maturation

Le bourgeonnement donne naissance à un virus non infectieux immature, et la protéine Gag est indispensable pour la formation de ces virions (Figure 8-11). De même, la protéine virale p6 est essentielle au recrutement de la machinerie cellulaire requise pour le bourgeonnement des particules virales [36]. La clôture du processus d'assemblage et la libération des virions immatures est possible grâce à la protéine virale p6 et à certaines protéines cellulaires, dont la protéine ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) [33,65]. Le bourgeonnement semble se produire préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques de la membrane cellulaire. Lors de cette étape, les glycoprotéines d'enveloppe (gp160) se retrouvent incorporées dans la membrane plasmique formant ainsi l'enveloppe de la particule virale. Pour être infectieux, les virions produits subissent obligatoirement des modifications radicales au niveau de leur structure interne ; c'est la maturation (Figure 8-12) [27,31]. Les protéines de structure se réarrangent pour former une particule virale mature et infectieuse. Ce processus de clivage protéolytique opère sur 5 positions différentes du précurseur Pr55Gag et semble être soumis à un processus ordonné et séquentiel contrôlé par différentes protéolyses intrinsèques (Figure 10) [27,32,36,39]. Dans un premier temps, un clivage très rapide au niveau de l'extrémité C-terminale du domaine SP-1 semble permettre la libération de la protéine p7 liée à l'ARN ce qui conduirait à la condensation du core ribonucléoprotéique (RNP) formé du complexe p7/ARN génomique viral [39]. Ensuite p24 serait séparée de la membrane par un clivage entre les domaines CA et MA, puis interviendrait le clivage final entre les domaines SP-1 et l'extrémité C-terminale de la CA, ce qui permettrait la condensation de la capside (Figure 10) [39]. Suite à ce processus de clivage du précurseur, les protéines de matrice forment une couche suivant la surface interne de l'enveloppe du virus [39]. Cette matrice contient les protéines de Capside matures qui vont se réassembler pour former la capside virale mature, de forme conique. Pour ce faire, le virion adopte différentes morphologies au cours de la maturation (A, B, C ou D), décrites dans la figure 10 [27,36].



**Figure 10:** Représentation schématique et par microscopie électronique des transitions morphologiques et biologiques des virions HIV-1 pendant la maturation.

Adapté de Sakuragi et al. [27].

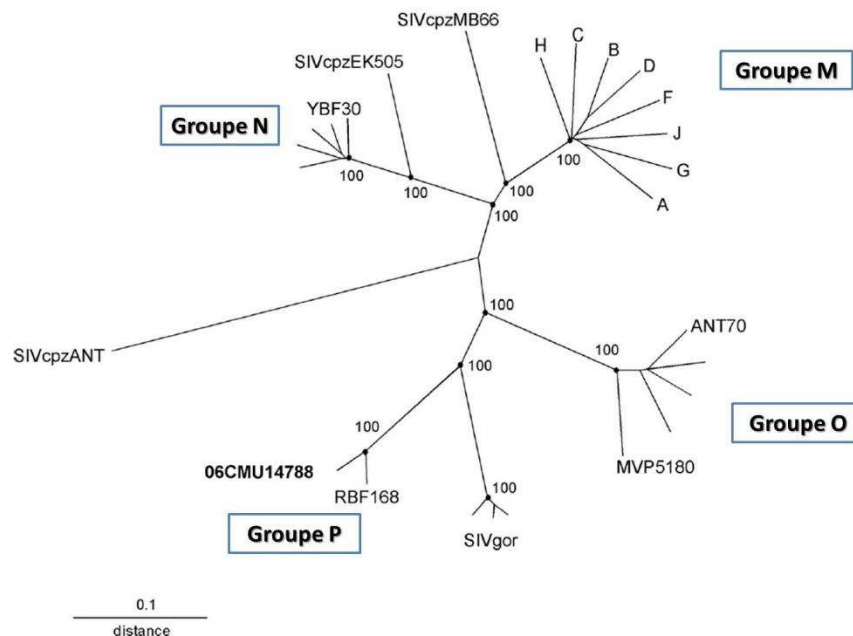
La maturation de HIV-1 est conduite par les précurseurs des protéines Gag, Pr55, et de Gag-Pol, Pr160. Ces précurseurs sont produits par un brin d'ARN viral non épissé, ciblé à la membrane par la myristoïlation de leur extrémité N-terminale [27]. Dans le virus mature, le génome viral se trouve à l'intérieur du core capsidique conique (Figures 4 et 10 D). Cette capside contient les enzymes virales RT et IN, ainsi que la protéine accessoire Vpr et le complexe RNP [27,32].

## II. Variabilité génétique

### A. Les variants génétiques de HIV

HIV-1 a été classé en trois groupes jusqu'en 1998 [66]: le groupe M (major) [67], le groupe O (outlier ou outgroup) [67,68] et le groupe N (non-M non-O) [69] pour lequel il n'existe que 7 cas

clairement identifiés [70]. En 2009 un 4<sup>ème</sup> groupe a été découvert et ajouté à cette classification, le groupe P, pour lequel seulement 2 cas sont identifiés à ce jour [71,72] (Figure 11).



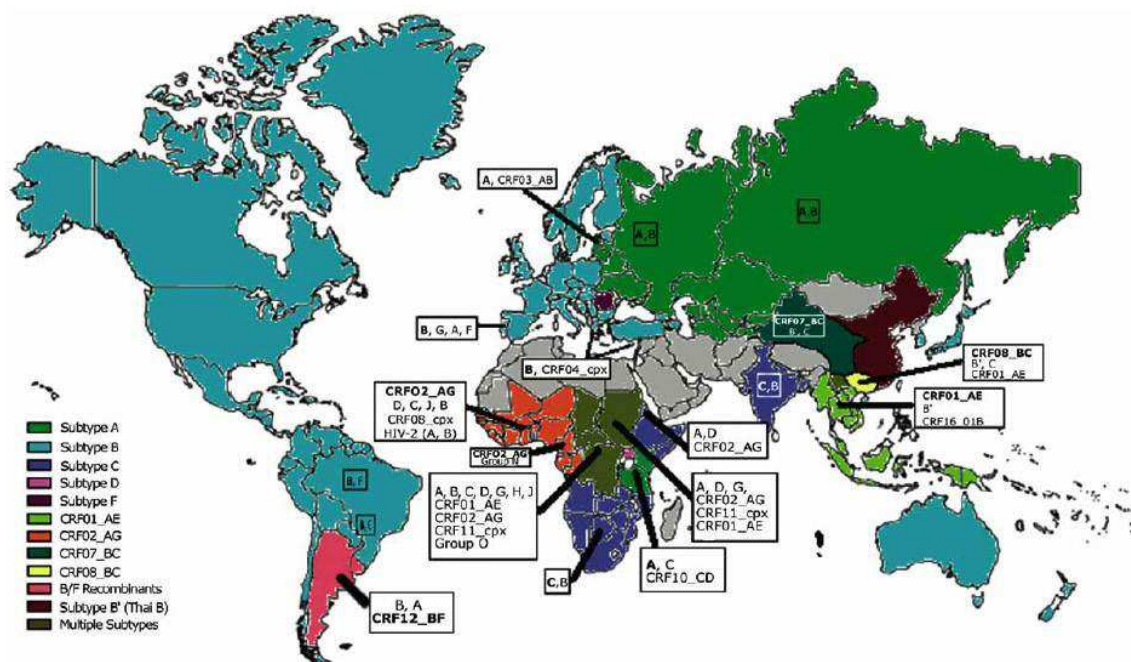
**Figure 11: Distribution phylogénétique des groupes viraux de HIV-1.**

D'après Vallari et al. [72].

*L'arbre phylogénétique est construit à partir de l'alignement nucléotidique des séquences génomiques. Chaque sous-type du groupe M est représenté séparément. Certaines souches de SIV sont également représentées. La reproductibilité des nœuds clé est représentée en pourcentage.*

Le groupe M, responsable de la pandémie, est le plus représenté, alors que les autres groupes sont essentiellement présents en Afrique centrale ou sous forme d'importés. Le groupe M, qui est le premier variant viral HIV à avoir traversé la barrière d'espèces du chimpanzé vers l'homme [1], est lui-même divisé en 9 sous-types, également appelés clades: de A à D, de F à H, J et K (Figure 11) [73]. S'ajoutent aux clades originelles des formes recombinantes, nommées CRF (Circulating Recombinant Forms), au nombre de 48 en 2007, nombre qui ne cesse d'augmenter (le nombre exact en 2012 n'est pas encore connu) [66,74]. Ces CRF portent leur nom en fonction des souches initialement recombinées. Par exemple la souche CRF02\_AG est une forme recombinante des souches de clades A et G [66]. La détermination du clade d'un virus se fait par l'analyse des séquences génétiques de *gag* et *env*, et plus particulièrement la partie V3 de la protéine d'enveloppe

gp120 [70]. Chaque sous-type montre de 25 à 35% de différences au niveau de la séquence protéique de l'enveloppe de HIV et 20% dans la protéine Gag [70]. Le sous-type le plus représenté en Europe est le clade B du groupe M, alors qu'en Afrique les clades A et C sont plus représentés. Cependant, avec les mouvements de populations de plus en plus fréquents et la stabilisation de l'épidémie, différents variants ont envahi les régions où ils étaient peu représentés. Par exemple, en Europe, d'autres variants HIV que le clade B ont été apportés. On dénombre ainsi près de 40% des infections HIV dues à des souches non-B, principalement la souche recombinante CRF02\_AG, qui est, avec le clade A, la souche prédominante en Afrique centrale et de l'ouest (Figure 12).



**Figure 12: Distribution géographique des variant de HIV.**

D'après Butler et al. [74].

*Les couleurs représentent les sous-types majoritairement représentés dans les différentes régions. Les autres variants représentés sont indiqués dans les encadrés.*

S'il a été démontré que les différents variants génétiques de HIV pouvaient avoir un tropisme différent, aucune étude n'a pu montrer clairement un rôle de la variabilité génétique de HIV dans sa capacité à infecter les cellules [74].

## ***B. Causes de la variabilité génétique de HIV***

HIV possède une variabilité génétique considérable qui peut s'expliquer par différents mécanismes : la vitesse de réplication, le nombre de mutations et la recombinaison génétique. Ce virus est capable de se répliquer rapidement dans les cellules, pouvant produire de 1 à 10 milliards de particules virales par jour (renouvellement de 50% des virions en 60h) [70]. De plus, lors de la réplication, le génome viral de HIV subit des mutations aléatoires (1 à 10 mutations par génome et par cycle). Ce taux de mutations aléatoires est alors plus de mille fois supérieure à celui observé dans le génome humain [70], étant donné que l'enzyme RT ne possède pas de système de relecture. Cela implique que chaque nouveau virion produit chez l'hôte comporte des mutations différentes. Dans un organisme infecté, il y a donc plusieurs variants génétiques constituant une quasi-espèce virale (i.e. une population de génomes viraux distincts, mais reliés). Un autre processus, qui intervient plus rarement et de façon aléatoire dans la variabilité génétique de HIV est la recombinaison génétique. Celle-ci intervient lorsque deux virus différents infectent la même cellule et que leurs génomes se recombinent [75].

Ces trois mécanismes induisent un grand nombre de variants mutés ; parmi eux beaucoup ne sont pas capables de se développer dans l'organisme et de résister aux pressions immunitaires (mutations délétères). Cependant cette perte est largement compensée par le grand nombre de virions produits dans un organisme, ce qui implique que beaucoup de variants ayant acquis une mutation favorable à leur réplication peuvent continuer à se répliquer, voir même devenir majoritaires. Cela explique en grande partie la difficulté à mettre au point un vaccin efficace contre HIV.

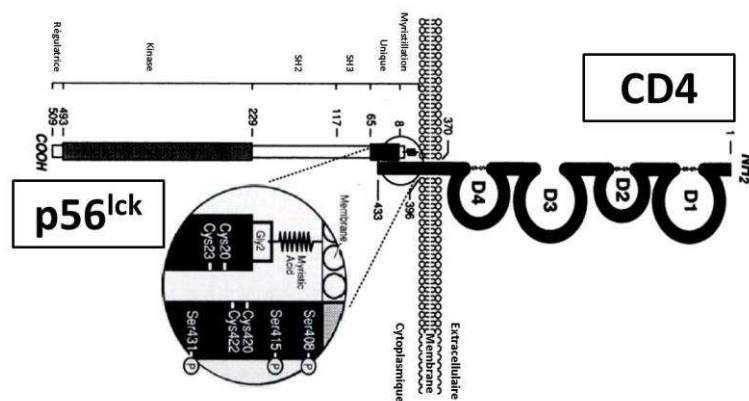
## **III. Cibles de HIV**

### ***A. Récepteurs***

Les rétrovirus sont capables d'utiliser une grande variété de récepteurs présents sur la membrane cellulaire afin d'infecter les cellules. Le récepteur majeur pour HIV est le marqueur de surface des LT CD4 [7]. Certaines molécules peuvent servir de corécepteur de HIV afin de faciliter son entrée dans certaines cellules cibles. De plus, HIV peut infecter des cellules qui n'expriment pas le récepteur CD4 et utilisent donc des récepteurs alternatifs.

## 1. Récepteur principal : la molécule CD4

Le récepteur CD4 est important dans la réponse immunitaire, l'activation des CPA et des LT, via sa liaison avec le TCR, ainsi que dans le développement thymique. C'est également le principal récepteur permettant l'entrée de HIV après interaction avec gp120. C'est une glycoprotéine membranaire de 58kDa, appartenant à la superfamille des Immunoglobulines, exprimée principalement à la surface des LT et des macrophages. CD4 est constitué de 4 domaines extracellulaires de type Immunoglobuline nommés D1 à D4 (ou V1 à V4) de 370 acides aminés, d'une région transmembranaire de 26 acides aminés et d'une queue cytoplasmique (38 acides aminés) liée à la protéine Tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> (qui permet la transduction du signal dans la cellule) (Figure 13). Le domaine D2 et la région D1 sont impliqués dans la liaison avec les molécules de CMH-II. La région D1 est également responsable de la liaison de CD4 avec gp120 [42].



**Figure 13:** Représentation schématique du récepteur CD4 en association avec la protéine p56<sup>lck</sup>.

Adapté de Geleziunas et al. [42].

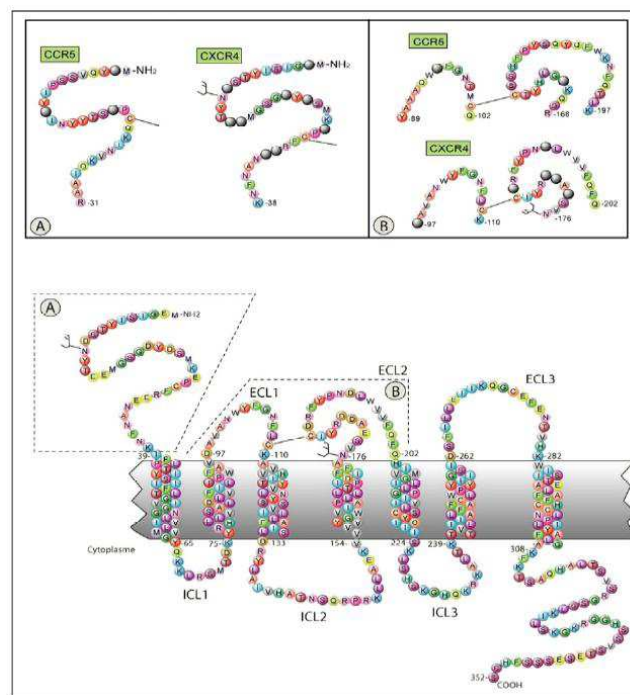
Dès les premières études sur HIV, il a été observé que les LT CD4 étaient largement détruits au cours de la maladie SIDA. La cause du SIDA ayant ensuite été attribuée à un rétrovirus [2,4], il a été montré dès 1984 que le récepteur CD4 pouvait être le récepteur majoritaire de HIV puisque l'utilisation d'anticorps anti-CD4 empêchait la réplication du virus *in vitro* [76,77].

Après présentation d'un antigène via le CMH-II ou lors d'une infection virale, l'expression du récepteur CD4 à la surface de la cellule hôte est sous-réglée, empêchant ainsi l'infection par de

nouveaux virus (HIV ou non) utilisant ce récepteur. En effet, la première infection induit la dissociation de la protéine p56<sup>lck</sup>, ce qui active la transduction du signal dans la cellule et entraîne l'internalisation du récepteur CD4 [42,59]. Les molécules CD4 nouvellement synthétisées sont capables de fixer les protéines gp160 dans le RE, empêchant ainsi leur transport et clivage en gp120 et gp41 au niveau du site d'assemblage des nouveaux virions [59]. Le récepteur CD4 est sous-régulé après infection par les protéines virales Nef et Vpu. La première agissant sur les récepteurs matures présents au niveau de la membrane cellulaire, et la seconde agissant sur les molécules CD4 nouvellement synthétisées dans le RE, selon des mécanismes différents [42,59].

## 2. Corécepteurs de CD4

Dans la plupart des cellules cibles, HIV a besoin de l'intervention d'un corécepteur pour faciliter l'établissement de l'infection. L'utilisation de ces corécepteurs permet également de déterminer le tropisme des différents variants du virus et de les classer.



**Figure 14: Représentation schématique des corécepteurs de HIV : CXCR4 et CCR5.**

D'après Berlier 2006.

*A : Structure de la région N-ter extracellulaire de CCR5 et CXCR4. B : Structure des boucles extracellulaires ECL1 et ECL2 de CCR5 et CXCR4. ECL : Boucle extracellulaire. ICL : Boucle Intracellulaire.*



Les 2 corécepteurs principaux de HIV sont les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5 qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G comportant une région N-terminale extracellulaire, 7 hélices-  $\alpha$  transmembranaires, 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires en C-ter. Le domaine N-terminal et les boucles extracellulaires sont impliqués dans l'affinité du corécepteur pour le ligand.

#### a. CXCR4

Le corécepteur aux chimiokines CXCR4 est exprimé par de nombreuses cellules, et majoritairement par les LT CD4 naïfs [78]. Il a tout d'abord été nommé « Fusine » lors de sa découverte, étant donnée son implication dans l'entrée par fusion des membranes de HIV avec la cellule cible [79,80]. La Fusine étant un récepteur spécifique des chimiokines de type « CXC SDF-1 », membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, elle a été renommée CXCR4 (4<sup>ème</sup> récepteur aux chimiokines CXC) (Figure 14) [81,82]. Le corécepteur CXCR4 est indispensable pour que les virus HIV à tropisme X4 infectent la majorité des cellules, notamment les LT CD4. En effet c'est grâce à cette protéine que l'enveloppe de HIV peut fusionner avec la cellule et donc l'infecter. La fixation de gp120 sur le corécepteur CXCR4 induit son internalisation et sa dégradation partielle par la cellule. Le ligand naturel de CXCR4 est SDF-1 (Stromal Derived Factor-1, ou CXCL12), dont la fixation induit également l'internalisation de CXCR4 membranaire et sa dégradation partielle (Tableau 2) [83]. Les domaines de CXCR4 impliqués dans l'interaction avec gp120 semblent être les boucles extracellulaires 1 et 2, alors que la partie N-ter semble jouer un rôle moins important dans cette interaction (Figure 14) [84].

En règle générale, les virus à tropisme X4 ne sont pas transmis, mais évoluent au cours de la maladie. Ils sont donc majoritairement présents chez les patients infectés depuis plusieurs années et les patients en stade SIDA. Les virus à tropisme X4 étaient associés à un mauvais pronostic vital avant l'utilisation de la trithérapie [20].

#### b. CCR5

Le corécepteur CCR5 est un récepteur spécifique des chimiokines de type « CC » [85]. Il comporte 4 résidus tyrosine au niveau de l'extrémité N-terminale du segment extracellulaire, qui peuvent être sulfatés, conférant ainsi une certaine hétérogénéité au corécepteur (Figure 14) [41]. Exprimé par les macrophages et les LT CD4 mémoires, il est le corécepteur utilisé par les virus à tropisme R5, variants viraux majeurs transmis lors d'une primo-contamination [78,85]. Il a été démontré en 1995 par Cocchi et coll. que les cytokines de type CC (Macrophage Inflammatory Protein (MIP) -1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES), sécrétées par les LT CD8, pouvaient inhiber la réplication des



virus infectant les macrophages mais pas les virus infectant les LT CD4 (Tableau 2) [84,86]. La fixation d'un des ligands naturels de CCR5, RANTES, induit l'internalisation du corécepteur, comme c'est le cas pour CXCR4 avec SDF-1, mais celui-ci n'est pas dégradé. Il est au contraire redistribué au niveau de la membrane plasmique [87]. Paxton et coll. ont montré que des patients exposés au HIV mais non infectés sont sensibles à l'infection par les virus à tropisme X4 mais insensibles à l'infection par les virus à tropisme R5 [88]. Par la suite, Dean et coll. ont observé qu'une mutation homozygote (délétion de 32 nucléotides, *ccr5Δ32*) dans le gène codant CCR5 confère une forte résistance, voire une protection, vis-à-vis de l'infection par HIV [89]. Associées à plusieurs autres, ces études ont permis de mener à l'identification de CCR5 comme corécepteur majeur de HIV [84].

L'ensemble des travaux précédents a mené à l'identification du processus de fusion des membranes entre le virus et la cellule comme étant primordial pour la réplication virale [79,84,86,88,90]. Les 2 corécepteurs principaux de HIV-1 sont CXCR4 et CCR5. Au moins 6 autres corécepteurs de HIV1, HIV-2 ou SIV ont été identifiés *in vitro* [CCR2b, CCR3, Bonzo (STRL33), BOB (GPR15) et US28] (Tableau 2). Si aucune implication dans la transmission via les muqueuses n'a été formellement démontrée *in vivo* pour ces corécepteurs alternatifs, leur implication dans l'entrée du virus dans certains types cellulaires et dans certains contextes ne peut être exclue [78,84,91].

**Tableau 2: Liste non exhaustive des corécepteurs principaux et alternatifs de HIV et leurs ligands naturels.**

Corécepteurs	Ligands
<b>Récepteurs humains aux chimiokines</b>	
CCR2b	MCP-1, -2, -3, -4
CCR3	Eotaxine-1 , -2, RANTES, MCP-2, -3, -4
CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2
CXCR4	SDF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$
<b>Récepteurs orphelins humains</b>	
BOB (GPR15)	?
Bonzo (STLR33)	?
<b>Récepteur viral de chimiokines</b>	
US28	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1

Adapté de Berger et al. [80].

### 3. Récepteurs alternatifs

Si le récepteur CD4 est majoritairement utilisé par le virus pour infecter les LT CD4 qui l'expriment fortement, HIV est cependant capable d'infecter différents types cellulaires indépendamment de CD4 [92]. Les récepteurs alternatifs, utilisés par HIV pour pénétrer dans les cellules n'exprimant pas CD4, notamment les cellules épithéliales génitales, ont été découverts plus tardivement. De nombreuses équipes travaillent encore sur ces récepteurs, dont certains sont majoritairement utilisés par HIV pour infecter certains types cellulaires [92].

#### a. Galactosyl Céramide (GalCer)

Le Galactosyl Céramide (GalCer) est un glycosphingolipide présent au niveau de la surface apicale des muqueuses gastro-intestinales, rectales et endocervicales et sur les DC immatures. Ce récepteur est utilisé par HIV pour pénétrer dans les cellules en absence de CD4 ; il constitue donc un récepteur alternatif de l'infection par HIV. GalCer est localisé dans les radeaux lipidiques, plateformes permettant un mouvement des différents récepteurs membranaires alors regroupés en leur sein, et qui joue un rôle important dans les phénomènes d'endocytose et de transcytose, mais aussi dans l'interaction de la cellule avec les pathogènes environnants [93]. Il a été montré que la protéine gp120 de HIV pouvait fixer GalCer exprimé par les cellules épithéliales [94]. Contrairement à celle qui a lieu entre gp41 et GalCer, l'interaction entre gp120 et GalCer n'est pas de type lectine, mais plutôt de type sucre-sucre [93]. En effet, Alfsen et Bomsel suggèrent que la liaison de HIV sur le récepteur GalCer des cellules épithéliales fait intervenir les sites lectine de gp41 (via ses résidus 650-685, motif conservé ELDKWAA), gp120, les radeaux lipidiques de la cellule contenant GalCer et le milieu extracellulaire présent à l'interface entre la cellule et le virus [93]. La fixation de gp120 sur GalCer, présent au niveau des radeaux lipidiques, induit leur stabilisation et un changement de conformation du récepteur alternatif qui peut ainsi interagir avec le site Lectine de gp41. Il a été suggéré que l'entrée de HIV à tropisme X4 (virus utilisant principalement le corécepteur CXCR4 pour infecter les cellules cibles) ou R5 (virus utilisant principalement le corécepteur CCR5 pour infecter les cellules cibles) dans la cellule épithéliale se fait via une voie d'endocytose, et que la dissociation de GalCer avec gp41 se produit après l'entrée dans la cellule, au niveau du compartiment endosomal [93,95].

#### b. Heparan Sulfate ProteoGlycans (HSPG)

Les récepteurs HSPG sont des polysaccharides hautement sulfatés, principalement exprimés à la surface des cellules épithéliales génitales, et utilisés comme facteurs d'attachement à la cellule par de nombreux virus, bactéries et parasites [56,96]. Les HSPG fixent préférentiellement les virus à

tropisme X4 comparé aux virus à tropisme R5 [96,97]. Ils sont associés aux radeaux lipidiques et forment des complexes avec les corécepteurs CXCR4 et CCR5 [98]. Les HSPG modulent les interactions gp120-corécepteur en altérant les contacts électrostatiques entre la boucle V3 chargée positivement, le domaine de liaison à la protéine gp120 et le domaine extracellulaire des corécepteurs, chargés négativement [97]. Les Syndecans, membres de la famille des HSPG, sont composés d'un petit domaine cytoplasmique et un domaine extracellulaire plus long portant 3 chaînes Heparan Sulfate [99]. Il existe 4 membres de la famille des Syndecans : Syndecan-1 exprimé sur les cellules épithéliales et plasmatiques, Syndecan-2 exprimé sur les cellules endothéliales et les fibroblastes, Syndecan-3 retrouvé initialement dans le système nerveux et Syndecan-4 exprimé de façon ubiquitaire [99]. De par leur répartition dans le corps humain, les Syndecans sont des protéines modulatrices dans diverses fonctions biologiques [99]. Tous les membres de la famille des Syndecans sont capables de capturer HIV-1, mais aussi HIV-2 et SIV, en interagissant avec la boucle V3 de gp120 [99,100].

Les HSPG, et notamment les Syndecans-2 et 4 sont fortement présents à la surface des macrophages et sont utilisés par HIV, avec les récepteurs au mannose (MR) et DC-SIGN, pour infecter ces cellules [99]. Lorsque le virus s'est fixé sur les Syndecans, celui-ci peut entrer dans la cellule-hôte via un mécanisme mal défini, mais n'impliquant pas de fusion des membranes. Le virus est protégé dans la cellule pendant plusieurs jours et conserve son pouvoir infectieux, puis il est transmis aux cellules permissives exprimant le récepteur CD4 [99].

### c. Gp340

La protéine gp340 est une protéine membranaire exprimée par les cellules épithéliales (cavité orale, génitales, pulmonaires, etc.). Ce récepteur est dérivé d'une protéine soluble, l'agglutinine salivaire (SAG) qui est une molécule anti-HIV sécrétée en grandes quantités par les glandes salivaires. Elle joue un rôle dans l'immunité innée au niveau de la surveillance des bactéries et fixe HIV via sa glycoprotéine d'enveloppe gp120, plus précisément au niveau de la boucle V3 [101]. Ce récepteur est présent au niveau de l'épithélium vaginal, sur la face externe des cellules épithéliales endocervicales et plus fortement au niveau de la région basale [101]. Les cellules endocervicales qui expriment ce récepteur montrent une grande capacité de fixation à HIV et peuvent infecter en *trans* d'autres cellules cibles de HIV (e.g. LT CD4). La fixation de HIV sur ce récepteur semble augmenter le pouvoir infectieux du virus par un mécanisme encore méconnu [101].

#### d. Récepteurs aux Lectines C

##### i. *DC-SIGN, DC-SIGNR*

DC-SIGN (C-type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-grabbing nonintegrin) et DC-SIGNR (DC-SIGN Related protein) sont exprimés par les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les cellules endothéliales.

DC-SIGN est une molécule d'adhésion intracellulaire de 44kDa, appartenant à la famille des récepteurs aux lectines C (CLR), spécifique des DC. C'est une protéine membranaire présentant un ecto-domaine contenant un court domaine N-terminal, une région répétée et un domaine C-terminal de reconnaissance des sucres (domaine lectine) [102]. Ce récepteur, présent au niveau des radeaux lipidiques, est capable de fixer HIV via sa liaison avec les mannoses et fucoses composant la protéine gp120 du virus et de le transmettre très efficacement aux LT CD4 par un mécanisme utilisant vraisemblablement les voies d'endocytose et d'exocytose des cellules [102,103].

La molécule DC-SIGNR est un récepteur relié au DC-SIGN jouant le même rôle au niveau des cellules endothéliales du placenta, du foie et des ganglions lymphatiques [102].

##### ii. *Langerine*

La Langerine appartient à la famille des CLR de type I. Elle est exprimée à la surface d'une sous-population de DC présentes dans la peau et les muqueuses, les cellules de Langerhans (LC). La Langerine semble jouer un rôle de barrière à l'infection par HIV. En effet, il a été montré que les LC de la peau sont capables de fixer HIV via la Langerine et d'internaliser ce virus afin de le dégrader, empêchant ainsi sa réplication et sa transmission [104]. Cependant il n'est pas exclu que certaines particules virales puissent échapper à cette dégradation après endocytose et ainsi infecter les LT CD4 en *trans* [105].

##### iii. *Récepteurs au mannose (MMR et MBL)*

Le MMR (Macrophage Mannose Receptor) et le MBL (Mannose Binding Lectin) appartiennent à la famille des CLR.

Le MMR est une protéine de 180kDa appartenant à la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors) qui reconnaissent les oligosaccharides riches en mannose sur les particules du non-Soi. Ces MMR, exprimés par les macrophages dérivés des monocytes (MDM) et les DC, sont impliqués dans la défense de l'hôte vis-à-vis de nombreux pathogènes. Ce récepteur est capable de lier HIV via les résidus mannoses situés en bout de chaîne de gp120 ; ces résidus représentent plus de la moitié

des sucres de cette glycoprotéine. Le MMR facilite la transmission de HIV des macrophages vers les LT CD4 [46].

Le MBL est une molécule effectrice du système immunitaire inné. Il est retrouvé sous forme soluble dans le sérum et se lie aux pathogènes (notamment HIV) via leurs sucres afin d'activer le système du complément. Le MBL a donc une activité anti-HIV en se liant aux mannoses hautement glycosylés de la protéine gp120 du virus [50].

Finalement, l'utilisation d'un récepteur par le virus pour infecter une cellule dépend donc majoritairement du type cellulaire et des récepteurs exprimés à leur surface, et n'implique pas les mêmes mécanismes d'entrée, ni les mêmes conséquences potentielles sur la transmission et la propagation de HIV. Si l'utilisation de CD4 induit une infection productive des cellules, due à l'entrée par fusion des membranes, avec une réplication virale dans ces cellules [61], l'utilisation d'un récepteur alternatif mène le plus souvent à une infection non productive des cellules, sans fusion des membranes et sans réplication virale, mais peut néanmoins aboutir à la transmission du virus intact aux cellules permissives où il pourra se répliquer.

## ***B. Cellules réceptrices au niveau des muqueuses***

### **1. Lymphocytes T CD4 (LT CD4)**

Les LT CD4 circulants sont les cellules-cibles principales de HIV et sont largement détruits durant la phase aiguë. Ils sont capables d'initier une transmission cellule-cellule efficace de HIV via l'établissement d'une synapse virologique dépendante du cytosquelette de la cellule et de l'enveloppe virale [105]. Les LT CD4 sont également fortement déplétés au niveau des muqueuses génitales féminines après infection [15,58].

Au niveau de la muqueuse cervico-vaginale les LT CD4 sont dispersés dans la *lamina propria* du vagin, l'exocol et l'endocol, formant souvent des clusters juste sous la membrane basale [15,106]. Ces cellules sont également présentes en nombre variable dans l'épithélium squameux du vagin et de l'exocol. La sous-muqueuse de l'endocol contient plus de LT CD4 que la sous-muqueuse de l'exocol [107]. La majorité des LT retrouvés dans les muqueuses génitales sont des LT CD4 mémoires, exprimant un taux de CCR5 plus élevé que les LT circulants [15,78]. Les LT CD4 mémoires, largement présents dans les muqueuses, sont plus efficacement infectés par les virus à tropisme R5. Cela peut être important pour la sélection de souches à tropisme R5 lors de la transmission hétérosexuelle de HIV étant donné que ces cellules sont plus facilement au contact des cellules infectées ou des

particules virales ayant traversé la muqueuse génitale féminine [105]. Certains types LT CD4, notamment les LT CD4 mémoires, sont un réservoir viral pour HIV. En effet le virus est capable de pénétrer dans ces cellules et d'entrer en latence, ce qui lui permet de persister dans la cellule hôte à long terme [108]. L'infection de ces cellules par HIV requiert la fusion de la membrane cellulaire avec l'enveloppe virale grâce à l'intervention des corécepteurs après fixation de gp120 au récepteur CD4 cellulaire [109]. Lorsque les LT CD4 présents au niveau des muqueuses sont infectées par HIV (dès 2h après contact), ils migrent et sont retrouvés dans le stroma des muqueuses 24h après infection [15]. Différentes études suggèrent que HIV infecterait préférentiellement les LT CD4 lors d'une transmission hétérosexuelle et que l'infection systémique serait donc établie par cette voie [15].

## 2. Cellules dendritiques (DC)

L'implication des DC dans la pathogénèse des *Lentivirus* est complexe. En effet de plusieurs variétés de DC expriment différents panels de récepteurs capables d'interagir avec des résidus mannose exprimés par la protéine gp120 de HIV [56,102]. Les DC sont capables de lier les particules virales sur leur surface membranaire sans être infectées. Elles peuvent maintenir cette liaison et garder le virus infectieux jusqu'à 5 jours et/ou favoriser l'infection des LT *in vitro*. Cela semble être dû à un mécanisme d'endocytose et de libération des particules virales, jusqu'à 10 fois plus infectieuses, par exocytose, sans production *de novo* [102,103]. Les DC, présentes au niveau des sous-muqueuses et dans la *lamina propria* de l'épithélium génital féminin, expriment le récepteur DC-SIGN, les récepteurs au mannose (MR) et CCR5, mais pas la Langerine, contrairement aux cellules de Langerhans (LC) localisées dans la muqueuse (décrites dans le chapitre suivant) [15,85,110]. L'endocytose, qui est le mode d'entrée majeur de HIV dans les DC, est possible notamment grâce à l'expression à la surface des DC du récepteur DC-SIGN [85,109]. Ce mode d'entrée, contrairement à l'entrée par fusion dans les LT CD4, donne lieu à une infection non productive chez la DC, celle-ci jouant alors un rôle de cellule réservoir avant de transmettre le virus en *trans* aux LT CD4 [105]. En effet, les DC capturent les virions au niveau des sites périphériques de l'infection et les amènent au niveau des ganglions lymphatiques, améliorant ainsi l'infection en *trans* des cellules exprimant les récepteurs d'entrée de HIV, principalement à tropisme R5. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la transmission du virus des DC vers les LT CD4 [15] : i) infection en *trans*, via une synapse virologique au niveau de laquelle les récepteurs de HIV et les virions sont concentrés, établie entre les DC infectées de façon non productive et les LT [111] ; ii) infection en *trans* via des virus associés à des exosomes dérivés des DC [103] ; iii) transmission de HIV des DC infectées de façon productive vers les LT CD4, via une synapse virologique [112].

Malgré la démonstration expérimentale de la réalité de ces mécanismes de transmission de HIV des DC vers les LT, leur rôle respectif dans la transmission par voie muqueuse est encore mal connu [15], ainsi que le mécanisme majoritairement impliqué dans le contexte d'une transmission muqueuse *in vivo*.

### 3. Cellules de Langerhans (LC)

Les LC sont des DC résidant au niveau de l'épithélium squameux de la peau ou des muqueuses. Au sein de la muqueuse vaginale, elles sont localisées dans la *lamina propria*, en grande quantité dans la couche épithéliale de la muqueuse vaginale et exocervicale [109]. Les LC expriment les récepteurs et corécepteurs de HIV, notamment CD4 et CCR5, ainsi que la Langerine. En revanche, elles n'expriment pas le corécepteur CXCR4 ni le DC-SIGN [15]. Dans la muqueuse génitale féminine les LC ont initialement un rôle de sentinelle afin de détecter les invasions par les pathogènes et les lésions au niveau de la surface épithéliale [109]. Elles vont ainsi étendre leurs dendrites jusqu'à la lumière vaginale pour capturer les antigènes viraux et migrer vers les organes lymphoïdes pour activer les LT immatures [15,110]. HIV est capable de détourner ce fonctionnement, puisqu'après activation des LC celles-ci deviennent sensibles à l'infection par HIV, ce qui facilite la dissémination du virus et l'infection des LT CD4 [15,16,110]. Ce phénomène est précoce, puisque des LC peuvent migrer très rapidement et être détectées au niveau des ganglions lymphatique seulement 30 minutes après stimulation [109]. De façon étonnante, la fixation de HIV aux LC via la Langerine entraînerait leur dégradation plutôt qu'une infection productive [104]. De plus, il est admis depuis longtemps que les LC du tractus génital inférieur sont capables d'internaliser HIV et de le séquestrer, intact, au moins 3 jours, notamment lorsque le virus se fixe à la LC via un autre récepteur que la Langerine [15,113].

Malgré de nombreuses études menées sur ce sujet, aucune donnée ne permet, jusqu'à présent, de savoir de façon certaine si les LC des épithéliums cervico-vaginaux sont capables de supporter une infection productive par HIV *in vivo*, ni si cette propriété est requise pour l'établissement de l'infection des LT sous muqueux dans le cadre d'une transmission hétérosexuelle.

### 4. Monocytes/Macrophages

Les monocytes sont des cellules mononucléées majoritairement présentes dans le sang périphérique, exprimant le récepteur principal de HIV, CD4, ainsi que le corécepteur CXCR4. En revanche ils n'expriment pas ou peu le corécepteur CCR5 et, comme les DC, ne sont pas infectables de manière productive par HIV [114]. Les monocytes sont des précurseurs d'une lignée de macrophages eux même nommés « Monocyte-Derived Macrophages » (MDM).

Les MDM sont des cellules de l'immunité capables de détecter la présence d'un pathogène et de l'éliminer par phagocytose. Cela leur permet de dégrader les antigènes du pathogène et de les présenter aux cellules de l'immunité acquise qui vont alors être activées. Les MDM, contrairement aux monocytes, expriment peu le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4, mais expriment largement le corécepteur CCR5. Ces cellules sont infectables par HIV, majoritairement à tropisme R5, mais le virus ne détruit pas ces cellules réservoirs *in vitro*. En effet, lorsqu'elles sont infectées par HIV, les MDM sont capables de produire du virus pendant plusieurs semaines, en culture [114]. Ces cellules sont présentes dans la muqueuse génitale féminine et sont sensibles à l'infection par HIV, et plus particulièrement par les virus à tropisme R5 [115]. Même si aucune donnée ne permet de savoir de façon certaine si ces cellules expriment le corécepteur CCR5 *in situ*, les macrophages présents dans le surnageant de culture organo-typique du vagin expriment ce corécepteur, ce qui suggère qu'elles expriment CCR5 lors de leur différenciation, activation et migration hors de la muqueuse [15,114].

En plus de l'utilisation de CCR5 pour fixer le virus, les macrophages sont capables de capter HIV via des Syndecans (famille des HSPG) ou par macro pinocytose (processus n'impliquant pas d'interaction enveloppe virale-récepteur cellulaire) [15,100]. En effet, Saïdi et coll. ont montré en 2007 et 2009 que HIV, majoritairement à tropisme R5, peut être transmis aux MDM via des récepteurs alternatifs, par les cellules épithéliales endocervicales après infections de ces dernières. Une fois que le virus est capté par les MDM, celui-ci est transmis aux LT, ce qui permet sa dissémination dans l'organisme [97,116]. Lorsque le virus est entré dans le macrophage, il peut être également archivé pendant plusieurs jours avant d'être potentiellement transmis aux LT CD4 *trans*. Ils représentent ainsi un réservoir pour HIV *in vivo* [100].

## 5. Autres cellules cibles

### a. Cellules épithéliales génitales féminines

Certaines études suggèrent que les cellules épithéliales génitales féminines peuvent être des cellules cibles de HIV, mais cette hypothèse est très controversée. En soutien de cette hypothèse, il a été démontré que les cellules épithéliales génitales féminines exprimaient certains récepteurs et corécepteurs de HIV, même si le niveau de cette expression est plus faible que dans les autres types cellulaires cibles de HIV [78]. L'implication des cellules épithéliales en tant que cellules cibles de HIV dans la transmission muqueuse est décrite plus en détail dans la partie « Transmission hétérosexuelle – Mécanismes de franchissement des muqueuses ».



#### b. Plaquettes

Les plaquettes sont de petites cellules sanguines anucléées connues majoritairement pour leur rôle dans la réparation vasculaire et le maintien de l'hémostase. Ces cellules sont pourtant de plus en plus étudiées pour leur rôle dans la réponse immunitaire, notamment via la présence de nombreuses molécules, dont des récepteurs membranaires de l'immunité innée (TLR) à leur surface [117–119]. Les plaquettes expriment les corécepteurs de HIV (CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR3 et CCR4) et le virus peut donc potentiellement pénétrer dans ces cellules. Cognasse et coll. ont montré en 2009 que les plaquettes étaient capables de lier HIV et de réagir à cette interaction par la sécrétion de cytokines et chimiokines jouant un rôle anti- ou pro-HIV (e.g. RANTES). Après avoir lié HIV par sa glycoprotéine d'enveloppe, les plaquettes semblent capables d'englober le virus et de l'emmener au niveau de sites sanctuaires [120]. Les plaquettes ne semblent pas capables de détruire le virus après l'avoir englobé. Ainsi, le rôle pro-HIV (échappement au système immunitaire, et migration dans des zones sanctuaires) ou anti-HIV (présentation à des cellules immunitaires capable de détruire le virus) de ce mécanisme n'est pas encore défini [120].

Ces études sont encore préliminaires et d'autres sont en cours, notamment au sein du laboratoire, afin d'élucider les mécanismes par lesquels les plaquettes pourraient jouer un rôle dans l'infection par HIV. Les plaquettes peuvent être recrutées au niveau de la muqueuse intestinale lors d'une inflammation [121], ce qui suggère qu'elles pourraient être des cellules cibles de HIV dans le cadre d'une transmission sexuelle (même si leur recrutement au niveau de la muqueuse génitale féminine reste à démontrer).

#### c. Cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont des lymphocytes connus pour leur rôle dans l'élimination de tumeurs et de cellules infectées par un virus, dans le cadre de l'immunité innée. Ces cellules sont importantes en première ligne en tant que médiateurs de la réponse immune dans les muqueuses [122,123]. Elles sont présentes notamment au niveau de la sous-muqueuse vaginale et exocervicale ainsi que dans la muqueuse gastro-intestinale. Au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, les cellules NK résident soit dans l'espace intra-épithélial (IEL : Intra-épithélial lymphocytes) soit dans la *lamina propria* (LP NK), leur localisation étant dépendante du statut sérologique HIV du patient. Il a été démontré que les IEL NK pourraient être impliquées dans le contrôle de la réplication virale au niveau de la muqueuse gastro-intestinale chez les patients traités et certains patient « élite-contrôleurs », qui sont capables de contrôler spontanément la réplication virale sans recours à un traitement

antirétroviral [123]. De plus les cellules NK pourraient compenser le manque de LT CD4 dans le tractus gastro-intestinal en se multipliant massivement [123].

Ainsi les cellules NK, quoi que peu étudiées, pourraient jouer un rôle important dans la protection contre HIV, notamment au niveau des muqueuses, de par leur fonction immunitaire et leur localisation dans différentes muqueuses. Leur rôle exact dans la protection de la muqueuse génitale féminine vis-à-vis de HIV reste cependant à déterminer.

#### d. Lymphocytes B (LB)

Les lymphocytes B (LB) sont notamment présents dans la muqueuse vaginale au niveau d'agrégats lymphoïdes ou de structures ressemblant à des follicules et semblent agir en tant que cellules présentatrices des antigènes (CPA) [106,109].

L'équipe de Rappocciolo a montré en 2006 que les LB activés, issues de la circulation sanguine et des amygdales, pouvaient internaliser HIV via un des récepteurs alternatifs de HIV, DC-SIGN, pendant au moins deux jours, et transmettre le virus infectieux aux LT en *trans* [124]. Cependant leur contribution à l'infection au sein de la muqueuse génitale féminine est encore à préciser.

# Transmission hétérosexuelle

## I. Tropisme et sélection R5

### A. Terminologie

La classification la plus ancienne de HIV était basée sur le type cellulaire que le virus infectait ; 3 classes de virus HIV-1 ont été décrites : TCL-tropic, M-tropic et dual-tropic. Les virus TCL-tropic étaient les virus infectant principalement les LT, les M-tropic ceux infectant majoritairement les monocytes-macrophages, et les dual tropic ceux capables d'infecter les deux types cellulaires [80,90,125]. La deuxième classification était basée sur la capacité du virus à induire des syncytia dans les cellules qu'il infectait, conduisant à la distinction entre virus SI (Syncytium Inducing) et virus NSI (Non Syncytium Inducing). Une troisième classification était basée sur la vitesse de réplication du virus en culture ; permettant de différencier les virus SL (Slow/Low), virus se répliquant lentement, des virus RH (Rapid/High) se répliquant rapidement. Ces nomenclatures, toutes complémentaires, ont été abandonnées en 1996 pour être remplacées par une nomenclature unique basée sur le corécepteur utilisé préférentiellement lors de l'infection [90,125,126].

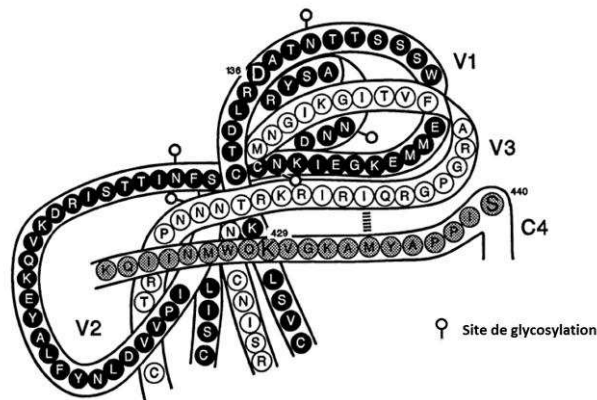
De cette manière trois types de virus ont été identifiés : les virus à tropisme X4 (utilisant le corécepteur CXCR4 pour infecter la cellule), les virus à tropisme R5 (utilisant le corécepteur CCR5) et les virus à tropisme R5X4 ou « dual-tropic » (capables d'infecter une cellule via le corécepteur CXCR4 ou le corécepteur CCR5 indifféremment) [90,125].

Les virus à tropisme R5 sont majoritairement transmis par voie sexuelle et sont prédominants au début de l'infection. Au cours de l'évolution de la maladie vers le stade SIDA, on observe un switch des virus à tropisme R5 vers des virus à tropisme X4 qui émergent lors des phases tardives de la maladie. Ces derniers sont plus virulents (ils se répliquent plus rapidement), et sont associés au déclin du taux de LT CD4 dans la maladie [127].

### B. Déterminants du tropisme

Les différentes études menées sur la détermination du tropisme viral ont permis de montrer que le passage, au cours de l'évolution de la maladie, d'un tropisme R5 vers un tropisme X4 est possible. Ce changement de tropisme est possible grâce à l'interaction entre différents domaines de la protéine gp160, tant au niveau de régions variables que de régions constantes (Figure 15). Les mutations dans les zones déterminantes du tropisme viral de gp160 induisent son changement de

conformation permettant l'exposition de certaines régions de liaison aux corécepteurs, mais aussi aux anticorps neutralisants (proches des sites d'attachement aux corécepteurs). Ce mécanisme permet ainsi au virus d'échapper au pouvoir neutralisant des anticorps neutralisants par l'organisme.



**Figure 15: Proposition d'interactions entre les domaines V1-V2, V3 et C4 de la glycoprotéine gp120 de HIV.**

D'après Carillo et al. [128].

La fixation du virus sur le corécepteur cellulaire se fait via les régions hypervariables V1-V2 et V3, de la gp120, en collaboration avec les régions constantes (C2 et C4 notamment). Ces domaines contiennent des séquences importantes pour la reconnaissance immunitaire [129], l'efficacité de réplication de HIV [130], mais aussi et surtout pour le tropisme du virus [131–134].

### 1. Boucle V3 de gp120

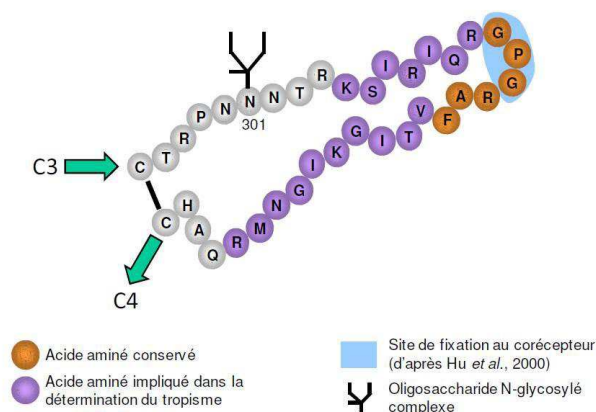
Avant l'utilisation de la classification actuelle pour le tropisme viral, des études de recombinaison génétiques ont permis de montrer que la région hypervariable V3 de gp120, située entre les acides aminés 296 et 331, est le principal déterminant viral au niveau de la boucle V3 impliqué dans le tropisme (Figure 16) [44,45,129,131,132,134]. Les mécanismes impliqués dans la détermination du tropisme viral ont été longuement étudiés et sont encore mal élucidés. Cependant diverses hypothèses sont évoquées et notamment la conformation de la boucle V3, ainsi que sa charge globale et sa composition en N-glycosylations.

#### a. Conformation de la boucle V3

Plusieurs études ont montré que la conformation de la boucle V3 de gp120 est importante dans la détermination du tropisme viral. La région de 30 acides aminés autour du codon 311 peut avoir jusqu'à 70% d'hétérogénéité entre les différents variants HIV (Figure 16), alors qu'un motif de 4 acides aminés (positions 309 à 312) est très bien conservé dans la plupart des souches du virus. Ce motif présente les acides aminés suivants : Glycine-Proline-Glycine-Arginine (GPGR), et semble responsable de la détermination du tropisme HIV au sein de la boucle V3 (Figure 16) [47,129,130,135]. Plusieurs études ont montré que la substitution d'un seul nucléotide au sein de la séquence de 30 acides aminés autour du codon 311 du domaine V3 peut changer la conformation de la glycoprotéine d'enveloppe et le tropisme du variant viral (Figure 15) [47,130].

#### b. Charge globale et composition en N-glycosylations

La variation de conformation de la boucle V3 de HIV n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la détermination du tropisme. Il existe également des variations de charge de la boucle V3 pouvant induire un changement de tropisme du virus ; les virus à tropisme R5 ayant une charge globale moins élevée dans la boucle V3 que les virus à tropisme X4 [135,136]. Cette différence de charge globale semble être due à un changement de charge au niveau des acides aminés 11 et 28 de la boucle V3, ceux-ci étant non chargés ou chargés négativement chez les virus à tropisme R5 et chargés positivement chez les virus à tropisme X4 [48,135]. Les glycosylations présentes sur la région V3 semblent également importantes pour la détermination du tropisme, notamment pour le switch d'un tropisme R5 vers un tropisme X4. Cette implication des N-glycosylation est dépendante de la charge globale de V3, puisqu'il semble y avoir une forte corrélation entre la charge de la boucle V3 et le faible nombre de N-glycosylation dans cette même région, pour la majorité des sous-types viraux (Figure 16) [137].



**Figure 16: Schéma représentant la structure de la boucle V3 de la protéine gp120 de HIV-1 (souche à tropisme X4).**

Adapté de Gram et al. [138].

Cependant, plusieurs études ont montré que le seul changement de charge globale ou de conformation de la boucle V3 ne suffit pas à changer le tropisme de HIV. En effet, différentes souches virales présentant le même tropisme peuvent avoir des séquences très variables au niveau de la boucle V3.

## 2. La région V1-V2 de gp120

Les régions variables V1-V2 semblent également impliquées dans la détermination du tropisme de HIV [28,47,133,136,137]. Chez les personnes nouvellement infectées par HIV, il existe une certaine homogénéité de séquence dans les régions V1-V2, qui ont des interactions physiques et fonctionnelles avec la boucle V3 (Figure 15). En effet, la région V1-V2 semble « recouvrir » les sites de liaison aux corécepteurs et au récepteur CD4 de la boucle V3 (Figure 15) [49,51,137,139,140].

Il a été montré que la région V1-V2 est importante pour conférer un tropisme R5X4 au HIV. En effet, des mutations dans cette région, notamment dans la région V1, peuvent conférer au virus la capacité d'utiliser le corécepteur CXCR4, sans diminuer sa capacité d'utiliser le corécepteur CCR5, quelle que soit la charge globale de la boucle V3 [137,141]. De plus, les N-glycosylations présentes au niveau des régions V1-V2 sont également importantes dans la détermination du tropisme de HIV, dans un contexte dépendant de sa charge globale et de la charge globale de la boucle V3

[49,137,142]. En effet, plusieurs études ont montré qu'une région hypervariable de la région V2 située entre les résidus 29 et 46 présente une forte implication dans le tropisme viral, et notamment le switch vers un tropisme X4. Cette implication semble intervenir en partie au niveau des sites de N-glycosylation présents dans cette région (Figure 15) [142,143].

### 3. Régions conservées de gp120

Les régions variables de gp120 ne sont pas les seules impliquées dans la détermination du tropisme viral. En effet, R. Willey et coll. ont montré en 1989 l'existence d'une interaction fonctionnelle entre la région V3 et la région constante C2 de gp120 [43]. Il a également été montré par mutation dirigée sur le résidu 282 de la région C2 de gp120 que cette région conservée est importante pour dans l'infectivité et la détermination du tropisme viral [47]. De plus, plusieurs études décrivent un rôle de la région constante C4 dans le tropisme du virus [49,128,144]. En effet, NG. Hoffman et coll. montrent que les résidus 424 et surtout 440 au niveau de la région C4 de gp120 montrent une forte corrélation avec le phénotype viral observé (Figure 15). Ainsi, le résidu 440 présentant une Arginine correspond à un tropisme R5, alors qu'un Acide Glutamique, une Glycine, une Sérine ou une Thréonine correspondent majoritairement à un phénotype X4 [49]. Cette même équipe suggère que la position 440 dans la région C4 est exposée à la surface du monomère de gp120, mais ce résidu ne semble pas être dirigé vers le corécepteur, ainsi l'importance de cet acide aminé est due à son interaction fonctionnelle avec la boucle V3 [49]. La position 424 de la région C4, quant à elle, n'est pas exposée à la surface de gp120. En revanche, ce résidu est situé à proximité des zones de contact avec CD4 ou CCR5. En effet, une mutation de ce résidu impact ainsi sur la conformation ou la flexibilité de ces zones de gp120 qui interagissent avec CD4 ou les corécepteurs de HIV [49].

### 4. Protéine gp41

Gp41 est la sous-unité transmembranaire de la glycoprotéine d'enveloppe de HIV qui est directement impliquée dans le processus de fusion. Plusieurs études ont démontré que la détermination du tropisme viral n'est pas un mécanisme unique, mais au contraire une interaction entre différentes parties de gp160. Une première étude menée par Kowalski et coll. a suggéré que gp41 est impliquée dans le changement de tropisme viral [145]. En allant plus loin, la même équipe a démontré en 1992 qu'une mutation dans gp41, et notamment dans sa partie N-terminale, affecte sa structure et ses propriétés fonctionnelles, ce qui induit des changements dans la reconnaissance du corécepteur d'entrée, et donc le tropisme du virus [146]. D'autres auteurs ont suggéré que les

changements observés lors d'un changement de tropisme sont dus à une pression de sélection non seulement virale (réplication) mais aussi immunitaire [144].

### C. Sélection R5

En 1993, l'équipe de Zhang a montré chez différents patients en phase de primo-infection HIV que le virus transmis possède des séquences nucléotidiques (ARN et ADN proviral) identiques, ou presque, au niveau des régions hypervariables V3 et V4 de gp120 [44]. Après génotypage de personnes nouvellement infectées par HIV, il a été montré que les séquences HIV présentes chez ces personnes sont relativement homogènes, alors que les génotypes des personnes contaminantes sont hétérogènes [139,147]. Par ailleurs, plusieurs équipes ont montré que, chez un donneur infecté par des souches R5 et X4, les virus majoritairement retrouvés chez le receveur ont un tropisme R5 [78,139,148,149]. Il a également été démontré qu'au niveau de sites riches en cellules cibles de souches à tropisme X4, comme le GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue), une infection prédominante de virus à tropisme R5 est observée, ce qui suggère que l'accessibilité au virus des cellules exprimant CXCR4 n'est pas la raison majeure de la transmission préférentielle des virus à tropisme R5. Cette observation est à rapprocher du fait que les personnes porteuses de la mutation homozygote *ccr5Δ32* sont insensibles à l'infection par HIV ; cela suggère qu'il existe une sélection de virus à tropisme R5 lors de la transmission de HIV, notamment lors d'une transmission sexuelle [127].

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans cette sélection à tropisme R5 : i) sélection au niveau du tractus génital masculin, ii) mécanismes impliqués lors de la transmission au niveau de la muqueuse génitale féminine, iii) sélection induite par le système immunitaire de l'hôte ; mais ceux-ci ne sont pas encore complètement compris [127]. Certaines hypothèses émises concernant ces mécanismes de sélection des souches R5 au niveau des tractus génitaux masculin et féminin sont décrites ci-dessous.

#### 1. Sélection dans le tractus génital masculin

Lors d'une transmission sexuelle, les premières étapes de sélection pourraient avoir lieu chez le donneur. La première hypothèse de la sélection R5 au niveau du tractus génital masculin vient du fait que le virus séminal associé aux cellules se réplique majoritairement dans les macrophages du sperme. Les macrophages étant préférentiellement infectés par les virus à tropisme R5, ceux-ci seraient donc préférentiellement transmis lors d'un contact sexuel [150]. Cette hypothèse ne suffit pourtant pas à expliquer le phénomène de sélection observé lors d'une transmission sexuelle. La sélection semble s'opérer notamment au niveau des organes du tractus génital masculin. Il a en effet été démontré en 2008 que la prostate est un site de production et de réplication de HIV, avec une



réplication des virus à tropisme R5 ou dual-tropique [151]. Cette différence de capacité de réplication entre les virus à tropisme R5 et X4 ne provient pas de l'absence de corécepteurs pour les virus à tropisme X4. Les corécepteurs CXCR4 et CCR5 sont tous les deux exprimés au niveau de ce tissu [151]. Les auteurs suggèrent que l'environnement cytokinique de la prostate inhibe l'entrée du virus à tropisme X4 ou sa réplication, notamment via la forte présence de cytokines SDF-1 [151], comme cela a déjà été montré pour les muqueuses génitales féminines [152]. La plupart des cellules immunitaires présentes au niveau de la prostate sont des LT CD4 fortement activés de façon chronique, ce qui permet leur infection par des virus à tropisme R5, mais pas à tropisme X4 [151]. Une hypothèse alternative suppose que les cellules exprimant le corécepteur CXCR4 dans la prostate sont majoritairement « naïves » (faiblement ou non activées), ou encore de type CD8, et donc réfractaires à la réplication de HIV [151]. Cette étude apporte un éclairage nouveau sur le rôle de la prostate et du tractus génital masculin dans la sélection de souches à tropisme R5.

## 2. Sélection dans le tractus génital féminin

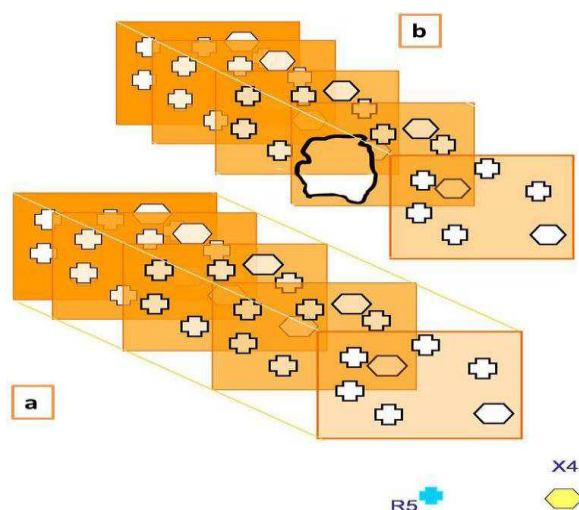
La sélection des virus à tropisme R5 a été démontrée dans le tractus génital féminin à plusieurs niveaux : i) expression des corécepteurs par les cellules épithéliales génitales, ii) molécules sécrétées par l'épithélium génital féminin, iii) cellules immunitaires présentes dans les muqueuses génitales féminines.

L'équipe de Zhang a émis l'hypothèse que le pattern d'expression des corécepteurs CCR5 et CXCR4, en particulier dans les muqueuses gastro-intestinales, pourrait jouer un rôle dans le phénomène de sélection R5, notamment de par le fait que les cellules exprimant CCR5 sont plus accessibles au virus que celles exprimant CXCR4 [78]. En revanche, les cellules de la muqueuse cervico-vaginale n'expriment que très peu, voire pas, le corécepteur CCR5, ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués lors d'une transmission hétérosexuelle [78]. De plus, les cellules de l'endocol expriment très fortement SDF-1, ligand naturel du CXCR4, qui est capable de sous-réguler l'expression de CXCR4 à la surface des cellules en signalisant son internalisation (cf. « Corécepteurs : CXCR4 »). Du fait de la séquestration par ces cellules des virus à tropisme X4, elles ont un rôle dans la protection vis-à-vis de l'infection par ces virus et donc dans la sélection des souches à tropisme R5 observée dans les primo-infections [152]. Cette hypothèse va dans le sens des travaux de Greenhead qui a montré en 2000 que les cellules cervico-vaginales sont plus facilement infectées par des virus à tropisme R5 que par des virus à tropisme X4 [115]. Parallèlement à cela, notre équipe a montré en 2005 que les cellules épithéliales génitales féminines pourraient séquestrer les virus à tropisme X4, suggérant un rôle de cette muqueuse dans la sélection des virus à tropisme R5 [153].

Le mucus sécrété par l'épithélium génital féminin lie préférentiellement les virus à tropisme X4 via des mucines poly-anioniques. En effet, Kwong et coll. ont montré que la boucle V3 des virus à tropisme X4 contient plus de charges cationiques exposées que celle des virus à tropisme R5, ce qui pourrait jouer un rôle dans la séquestration des virus à tropisme X4. L'interaction des virus X4 avec les mucines poly-anioniques présentes dans le mucus cervical pourrait favoriser leur élimination ou la détérioration de leur pouvoir infectieux [127,154].

Saïdi et coll. ont démontré en 2007 dans un modèle *in vitro* que les cellules épithéliales de l'endomètre sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines attirant les monocytes-macrophages après contact avec des virus à tropisme R5, mais pas après contact avec le virus X4 [97], ce qui suggère un rôle dans la sélection R5. De plus, les cellules immunitaires présentes au niveau des muqueuses génitales féminines, telles que les LC, les DC ou les macrophages, peuvent également jouer un rôle dans la sélection des virus à tropisme R5, même si ces rôles potentiels ne sont pas toujours observés *in vivo* [90]. Leur implication dans ces mécanismes est également brièvement décrite dans le chapitre « cellule-cibles ».

La transmission des souches R5 par voie sexuelle de HIV est donc vraisemblablement due à une succession de filtres se situant à plusieurs niveaux, et non à un mécanisme unique sélectionnant la réplication des virus R5 et empêchant le passage et la réplication des virus X4 (Figure 17) [90,127].



**Figure 17: Théorie des multiples barrières agissant sur la sélection des virus à tropisme R5.**

Adapté de Grivel et al. [90]

*Chaque barrière n'est pas efficace à 100% dans la sélection, mais l'addition de toutes les barrières existantes aboutit à une sélection quasi-totale (a). Ainsi, même si une brèche est introduite dans l'une des barrières, la sélection reste efficace (b).*

## II. Compartimentation et réservoirs

### A. Notion de compartimentation

Dans l'organisme humain le virus HIV est retrouvé dans divers compartiments anatomiquement séparés les uns des autres et notamment le compartiment sanguin, le compartiment génital, le compartiment cérébral et le compartiment gastro-intestinal. Il a été établi qu'il existe une quasi-espèce virale au sein d'un organisme donné pouvant, au moins en partie, être répartie entre les différents compartiments anatomiques ; ainsi différents variants de HIV peuvent être retrouvés dans ces compartiments [108,155–157].

La notion de compartimentation de HIV dans le tractus génital masculin ou le système nerveux central est établie par la démonstration de l'existence de populations virales distinctes entre le secteur sanguin, le secteur cérébral et le secteur génital. Ces populations virales se différencient notamment au niveau du gène de la protéase [158] et de la protéine d'enveloppe gp160 [139,155,159], mais aussi au niveau des mutations de résistance aux traitements, qui sont différentes entre le compartiment sanguin et le compartiment séminal [160]. Elles se caractérisent également par une absence de corrélation entre la charge virale sanguine et la charge virale séminale, ou encore par la présence de particules virales infectieuses dans le compartiment séminal, en l'absence de charge virale détectable dans le compartiment sanguin [161,162]. L'équipe de Korber a montré en 1994 que l'hétérogénéité des séquences observée entre les compartiments sanguins et cérébraux concernait la boucle V3, au niveau de positions d'acides aminés hautement conservées. Ces 7 acides aminés, dont 6 sont situés dans la région V3 et un dans la région C2, représentent une « signature du pattern cérébral » [155]. A noter que la majorité des variants viraux retrouvés dans le tissu cérébral des patients infectés avait un tropisme R5 et que la charge globale de la boucle V3 était plus faible que celle observée dans le compartiment sanguin. Il a été montré par ailleurs que la séquence de la région V3 est différente dans le sang (plasma et PBMC, cellules mononucléées du sang) et dans le sperme (plasma et NSMC, cellules mononucléées non spermatozoïdes, du sperme) chez 60% des donneurs, et que la séquence de cette région hypervariable est bien conservée chez le receveur pendant au moins 6 mois [139,161].

Il existe également des différences entre le compartiment cellulaire et le compartiment plasmatique. En effet, même lorsque le compartiment plasmatique du tractus génital masculin présente une charge virale indétectable, de l'ADN proviral peut être détecté dans les NSMC [157,162,163]. Plusieurs études ont montré que le virus libre retrouvé dans le liquide séminal est différent, au niveau de l'enveloppe notamment (e.g. charge globale, nombre de glycosylations,

tropisme), de celui retrouvé dans les NSMC. Cela indique que le virus libre présent dans le sperme ne provient pas forcément de la réplication dans les NSMC, mais semble produit par les organes du tissu génital masculin [157,164,165].

Selon Zhu et coll., le virus transmis lors d'une contamination par voie hétérosexuelle correspond à un variant minoritaire présent chez le donneur ; il serait habituellement issu des NSMC (virus associé aux cellules) du donneur infecté, ou, dans de rares cas, du plasma séminal (virus libre) [139,148]. Cela suggère que certaines étapes impliquées dans la sélection des virus à tropisme R5 se déroulent au niveau de la muqueuse génitale féminine, et au moment de la dissémination du virus dans l'organisme.

Le tractus gastro-intestinal est également un compartiment anatomique bien connu. En effet, tôt après le début de l'infection par HIV, le virus détruit le système immunitaire local du compartiment intestinal (GALT), notamment les LT CD4 exprimant fortement CCR5 [23,166–168]. La destruction massive du système immunitaire dans ce compartiment est le plus souvent irréversible ; en effet, malgré un traitement antirétroviral intensif et efficace au niveau sanguin, une reconstitution incomplète du système immunitaire est observée [23,166,168]. Les mécanismes impliqués dans la reconstitution du système immunitaire du GALT chez les personnes infectées par HIV sont encore mal connus [166,168]. Le compartiment gastro-intestinal est un site privilégié de réplication du virus au sein duquel une réplication résiduelle persiste en dépit de la prise d'un traitement antirétroviral efficace dans le compartiment sanguin, ce qui pourrait expliquer en partie la reconstitution partielle du système immunitaire du GALT [166,168]. Il a été montré que 60% des LT CD4 CCR5+ du GALT sont infectés par HIV *in vivo*, ce qui suggère que ce compartiment est également un réservoir de la réplication du virus dans l'organisme [166].

### ***B. Notion de réservoir viral***

Lors de l'infection par HIV, le virus est capable de se servir de l'organisme-hôte pour échapper aux défenses immunitaires et aux traitements antirétroviraux visant à le détruire. En effet, certains sites anatomiques (e.g. le système nerveux central) ou cellulaires (e.g. cellules quiescentes, cellules épithéliales) permettent au virus de se répliquer ou de persister dans l'organisme malgré les différentes stratégies mises en places pour le détruire [40,108,157]. Ces sites sont des réservoirs viraux empêchant l'éradication du virus et permettant la persistance de l'infection HIV dans l'organisme [108,157,165]. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'établissement de la latence provirale et des réservoirs, impliquant à la fois des facteurs viraux (e.g. Tat) et des facteurs cellulaires (e.g. NF- $\kappa$ B) [40,108].

HIV est capable d'intégrer son génome dans des régions du génome de la cellule hôte peu, ou non actives sous l'angle transcriptionnel, établissant ainsi une persistance à long terme des informations génétiques virales au sein de l'organisme [40,108]. Cela lui permet d'entrer en phase de latence clinique voire de se réactiver notamment lorsque la pression est plus faible (e.g. arrêt du traitement antirétroviral), ou lors d'une stimulation (e.g. environnement pro-inflammatoire, coïnfection). La présence du provirus de manière latente dans certains compartiments anatomiques ou cellulaires en font des réservoirs viraux [108]. Le génome proviral intégré, retrouvé dans ces cellules sanguines au cours de l'infection, est représentatif du variant viral initial. Le provirus ainsi séquestré dans les cellules immunitaires sanguines (e.g. LT mémoires, macrophages et DC) ne semble pas capable de se répliquer (produire du virus) et représente donc un réservoir viral dans l'organisme, en attendant d'être transmis aux cellules permissives (voir « Cellules cibles ») [40,44].

Il existe également des réservoirs viraux au niveau de compartiments anatomiques qui ont été décrits précédemment (cf. « Notion de compartimentation ») [108]. Le tractus génital masculin a été décrit comme un réservoir anatomique de HIV, puisqu'il produit des virus au niveau local et que ceux-ci peuvent persister dans le sperme de patients infectés malgré un traitement antirétroviral intensif et une charge virale plasmatique indétectable [150,157,165,169]. De plus, Wu et coll. ont montré que les cellules épithéliales génitales sont capables de transmettre le virus à des cellules immunitaires par contact cellule-cellule, et que ce virus semble « protégé » par la cellule, ce qui maintient son pouvoir infectieux, suggérant ainsi que ces cellules peuvent également jouer un rôle de réservoir [170]. Il a été démontré au sein du laboratoire, par des techniques de biologie moléculaire sur lignées de cellules épithéliales génitales, que celles-ci sont capables de séquestrer les virus à tropisme X4 [153]. Cela constitue un autre argument pour le rôle de réservoir des cellules épithéliales génitales et suggère un rôle potentiel de celles-ci dans la sélection à tropisme R5 [153].

### III. Traitements

L'administration d'un traitement antirétroviral aux personnes infectées est, aujourd'hui, la seule stratégie d'amélioration de la survie des patients. Vingt-cinq molécules antirétrovirales sont actuellement disponibles et administrées majoritairement sous forme de trithérapie [23,108,171]. Pourtant, en 2007, seulement 1 personne sur 4 nécessitant un traitement antirétroviral y avait accès [171].

La fréquence de transmission du virus est directement associée à la charge virale plasmatique et séminale [172]. Dans la majorité des cas, les traitements antirétroviraux permettent de réduire efficacement la charge virale dans le sang et le sperme ainsi que de préserver ou restaurer

l'immunité chez les patients infectés [162,173,174], mais en aucun cas d'éradiquer le virus présent dans l'organisme. En effet, une petite proportion de virus persiste dans les compartiments plasmatiques et de l'ADN proviral peut être retrouvé dans les compartiments cellulaires de patients infectés et traités [108,150,157,165,167,171]. Sachant que le traitement est efficace dans le sang et dans le sperme chez la majorité des patients [173,175,176], en 2008, les recommandations officielles suisses annoncent que si la charge virale dans le sperme et dans le sang est indétectable chez un patient traité et contrôlé, en absence de coinfection, alors le risque de transmission du virus par voie sexuelle est négligeable [177]. Cependant, malgré l'amélioration de la survie des patients infectés, l'infection HIV reste incurable selon la stratégie actuelle de traitement [108,171].

Par ailleurs, du fait de la compartimentation anatomique entre les secteurs sanguins et séminaux, tous les traitements antirétroviraux ne sont pas capables de diffuser efficacement à travers la barrière hémato-génitales [178] : de l'ARN viral et de l'ADN proviral peuvent donc être retrouvés dans le sperme d'une minorité d'hommes infectés, malgré une charge virale indétectable dans le sang [9,157,162,179–182]. En effet, la persistance de particules virales libres ou associées aux cellules dans le sperme représente de 10 à 48% des patients traités présentant une charge virale sanguine indétectable [157] ; aussi, le risque d'infection sexuelle et d'émergence de virions résistants, aussi faible soit-il, existe, quel que soit le stade d'infection, en absence de traitement efficace au niveau séminal [162,183]. Cependant, ces études s'appuient sur la détection d'ARN ou d'ADN proviral dans le plasma séminal ou les NSMC d'hommes infectés par PCR, mais aucune n'a pu prouver jusqu'à présent le caractère infectieux ou répliatif du virus.

La stratégie actuelle de traitement ne permettant pas d'écarter entièrement les risques de transmission sexuelle, plusieurs études ont été, et continuent à être, menées afin de tester différentes modalités de traitement visant à rendre non infectieux les individus infectés [40,108,161,171,184,185]. Une des stratégies testées est celle du « test and treat » qui vise à renforcer le dépistage et traiter les personnes séropositives immédiatement, sans attendre le seuil de charge virale et le nombre de LT CD4 préconisé par l'OMS (actuellement 350 LT CD4 par mm<sup>3</sup>) [108]. Un essai de ce type, nommé TasP ou HPTN 052, publié récemment, contenant 97% de couples hétérosexuels séro-différents, a montré une efficacité vis-à-vis de la transmission sexuelle de 96% [162,171,186].

D'autres études sont menées sur l'élaboration de traitements préventifs plutôt que curatifs, tels que les vaccins prophylactiques ou encore l'utilisation de microbicides au niveau des muqueuses génitales féminines [108,185,187,188]. Une stratégie de type PreP, « Pre-exposure Prevention » a également été testée, avec l'essai CAPRISA 004 par exemple, testant l'efficacité d'un gel de Ténofovir

utilisé comme microbicide. Cet essai a montré une réduction de 39% de la transmission sexuelle de HIV de l'homme vers la femme [189]. C'est un des premiers essais cliniques sur microbicide, montrant une efficacité, sans toxicité avérée pour la muqueuse génitale féminine, et donc un espoir pour le développement d'une méthode efficace de prévention de la transmission, contrôlée directement par les femmes [190].

## IV. HIV et transmission hétérosexuelle

Lors d'un rapport hétérosexuel, le virus présent dans le sperme de l'homme infecté entre en contact avec la muqueuse génitale féminine non infectée et peut pénétrer dans l'organisme via différents sites au sein de cette muqueuse, en empruntant plusieurs voies de transmission dont les principales sont présentées dans les chapitres ci-dessous.

### A. *Le tractus génital féminin*

#### 1. Composition et sites de pénétration

##### a. Cellules épithéliales

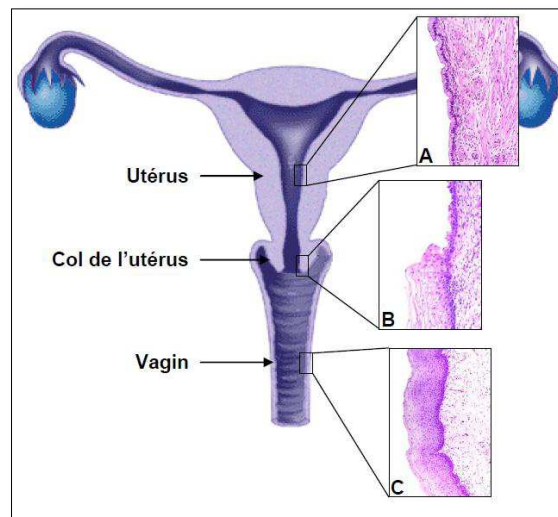
La muqueuse génitale féminine est constituée de trois compartiments : le tractus génital inférieur qui correspond au vagin et à l'exocol, le tractus génital supérieur, correspondant à l'endocol, l'endomètre et les trompes de Fallope. Le troisième compartiment correspond à la zone de transition (ou zone de transformation) entre l'exocol et l'endocol (Figure 18) [16,191].

Le vagin et l'exocol sont constitués d'une multicouche de cellules épithéliales squameuses, kératinisées (vagin) ou non (exocol) (Figure 18) [16,184,192]. La desquamation des couches supérieures des cellules dans cette zone leur confère une protection contre les pathogènes, car il est plus difficile d'y établir une infection persistante [16,191]. De plus, Michélini et coll. suggèrent que la régénération de l'épithélium squameux de l'exocol favorise le recrutement des leucocytes à partir du stroma, probablement via la sécrétion de cytokines ou de facteurs de croissance [192]. Cependant, le vagin et l'exocol présentent une plus grande accessibilité et une plus grande surface cellulaire (15 fois supérieure à celle de l'endocol) et donc une plus grande zone de contact avec les pathogènes, notamment HIV. La présence de brèches augmente encore le risque d'infection lors d'une relation sexuelle [15,191].

En revanche l'endocol est constitué d'une monocouche de cellules, procurant une protection moindre contre les pathogènes (Figure 18) [16,90,184,191,193]. Cet épithélium, plissé en cryptes endocervicales ressemblant faussement à des glandes, est constitué de cellules sécrétant le mucus

cervical (mucine) dont la quantité et la qualité varient au cours du cycle menstruel [194]. L'introduction du sperme lors d'un rapport hétérosexuel non protégé qui induit le recrutement massif de neutrophiles à travers l'épithélium endocervical afin de détruire l'excès de spermatozoïdes. Cela crée une inflammation dans la sous-muqueuse, notamment au niveau de l'endocol, facilitant l'infection par HIV [16].

La zone de transition fait le lien entre la monocouche cellulaire de l'endocol et la multicouche cellulaire de l'exocol (Figure 18). Cette zone est très riche en cellules immunitaires, notamment en LT CD4, et sécrète moins de mucus que l'épithélium endocervical, ce qui la rend particulièrement sensible à l'infection par HIV [15,107,122,184].



**Figure 18: Représentation schématique et coupes histologiques de l'appareil génital féminin et des muqueuses le composant.**

*A : Epithélium monostratifié de l'endocol. B : Epithélium transitionnel de la zone de transformation. C : Epithélium pluristratifié de la muqueuse vaginale.*

#### **b. Cellules immunitaires de la muqueuse**

Le tractus génital féminin est majoritairement composé de cellules épithéliales, mais il contient également des cellules de l'immunité [184]. La nature, la localisation et le nombre de ces cellules immunitaires diffèrent en fonction de la muqueuse (vagin, exocol, zone de transition,



endocol) mais aussi en fonction de facteurs environnementaux (e.g. coinfection, inflammation, contraception) [122,167,192,195]. L'immunité cellulaire muqueuse du tractus génital inférieur est composée de DC, monocytes/macrophages, LT et LB, localisées au niveau de la *lamina propria* de l'épithélium vaginal et exocervical [152].

En absence d'inflammation, la zone de transition contient la plus grande quantité de cellules immunitaires, comparée aux muqueuses vaginales et cervicales (endo- et exo-). Cette zone contient notamment beaucoup de macrophages, LT CD4 et LT CD8 ainsi que des granulocytes. Des DC sont également présentes au niveau de la face exocervicale de la zone de transition, mais pas au niveau de sa partie endocervicale [90,109]. Contrairement à la zone de transition, la muqueuse vaginale contient de nombreux LT CD8 (60% des LT totaux) localisés dans les couches profondes de l'épithélium vaginal ou dans la *lamina propria* superficielle, mais peu de LT CD4, de macrophages et de DC [122,152]. L'exocol quant à lui contient beaucoup plus de DC, LT CD8 et LT CD4 que la muqueuse vaginale ; il contient également des LC et des macrophages en faible quantité, surtout au niveau de la sous-muqueuse [122,192,195]. Au niveau de la muqueuse endocervicale on retrouve des granulocytes en quantité variable, des macrophages, mais peu de LT CD8 et de LT CD4 et pas de DC. En présence d'une inflammation, cette distribution est désorganisée, en fonction de l'origine de l'inflammation. La nouvelle composition en cellules immunitaire dans les différentes muqueuses du tractus génital féminin n'est pas clairement définie [122,195]. Patterson et coll. ont cependant noté une faible augmentation du nombre de macrophages et de LT CD4 mémoire dans les muqueuses exocervicales inflammées qu'ils ont observées (progestérone, coinfection virale ou ulcère génital non infectieux), sans modification dans la composition en LC [195].

Au cours de la vie d'une femme, le tractus génital féminin est altéré par des événements endocriniens, infectieux et mécaniques. Certaines de ces actions induisent des changements dans la structure ou la fonction des cellules composant ces muqueuses [167]. C'est pourquoi la muqueuse génitale féminine a des mécanismes de défenses lui permettant de conserver son intégrité.

## 2. Mécanismes de défense de la muqueuse génitale féminine

La muqueuse génitale féminine est équipée de nombreux mécanismes de défense contre les pathogènes du tractus génital, incluant HIV. On peut séparer ces mécanismes protecteurs en 3 catégories : les composés sécrétés, les composés associés aux cellules et les composés sécrétés après induction.

#### a. Composés sécrétés

Le pH basal de la muqueuse vaginale est relativement acide (pH 4), ce qui lui confère une protection vis-à-vis de l'infection microbienne. Cependant, dans certaines conditions (e.g. infection vaginale), le microenvironnement vaginal peut être endommagé, ce qui se traduit notamment par un dérèglement de la flore bactérienne commensale vaginale (*Lactobacillus* sp.), et le pH vaginal peut ainsi augmenter jusqu'à atteindre la neutralité favorable au développement des pathogènes [16]. Le pH vaginal augmente également lors de rapports hétérosexuels, au moment du contact de la muqueuse avec le sperme (le pH passe de 4 à 6). Cela augmenterait de 60 à 70 fois le taux de diffusion des virions HIV dans le mucus cervical [16,196,197].

Les cellules de la muqueuse génitale féminine produisent un glycocalyx à la surface de la couche cellulaire lui conférant des propriétés hydrophiles, ainsi qu'une barrière muqueuse (mucus épais de glycoprotéines hydrophobes) [90,191]. Le mucus sécrété par les cellules de l'épithélium endocervical joue un rôle dans la lubrification du tractus génital inférieur, prévenant ainsi l'entrée de micro-organismes pathogènes dans l'utérus [167,185]. En fonction du cycle menstruel, et donc de la quantité d'œstrogènes, les sécrétions endocervicales peuvent soit faciliter la pénétration du sperme lors d'un rapport sexuel, soit contenir des leucocytes (e.g. monocytes/macrophages, LT, DC, LC,) qui vont agir comme une barrière vis-à-vis des agents exogènes [90,194].

De plus, les cellules épithéliales du tractus génital féminin produisent, dans leurs sécrétions, de nombreuses protéines présentant une activité anti-HIV, notamment SLPI (secretory leukocytes protease inhibitor), SDF-1, la lactoferrine, les  $\beta$ -défensines, MIP-1 $\beta$ , RANTES et la Trappine/Elafine [90,167,185,191]. Les protéines SLPI sont sécrétées par les cellules épithéliales génitales. Elles ont la particularité de pouvoir empêcher l'infection par HIV dans des modèles *in vitro*, leur suggérant un rôle important dans la défense de la muqueuse génitale féminine vis-à-vis de l'infection par HIV [191]. La lactoferrine est une protéine présente dans le lait maternel et dans le tractus génital féminin. Cette protéine a la capacité d'agir *in vitro* au cours des stades précoces de la réplication de HIV en inhibant l'infection et bloquant l'adsorption ainsi que la prise en charge du virus par la cellule cible [191]. La Trappine/Elafine, possédant une activité antimicrobienne, semble être un biomarqueur de la protection contre l'infection par HIV, puisqu'elle est surexprimée dans les sécrétion cervico-vaginales de femmes hautement exposées au HIV, non infectées [167]. Les  $\beta$ -défensines sont de petites protéines cationiques produites dans le tractus génital féminin, sous contrôle hormonal, qui ont un effet antimicrobien, la hBD-2 (human  $\beta$ -défensine 2) est sécrétée par les cellules épithéliales en réponse à un environnement pro-inflammatoire, marqué par la présence d'IL-1 $\beta$  ou de TNF- $\alpha$ , et est surexprimée en cas de coinfections. Elle semble participer à la réponse immunitaire

vaginale via sa fonction antimicrobienne lors d'une infection par HIV, plus particulièrement vis-à-vis des virus à tropisme X4 [90,167,191,198].

Des IgA et des IgG sont également retrouvées dans les muqueuses génitales féminines. La présence de ces immunoglobulines pourrait représenter une barrière supplémentaire vis-à-vis de l'infection par HIV. En effet, certaines études montrent que des IgA spécifiques de HIV sont retrouvées dans les sécrétions cervico-vaginales de femmes hautement exposées non infectées par HIV. Ces IgA semblent avoir un pouvoir neutralisant sur HIV et bloquer la transcytose du virus à travers la muqueuse génitale féminine [167].

D'autres composés sont sécrétés par la muqueuse génitale féminine et pourraient jouer un rôle dans la défense des muqueuses contre HIV, tels que des enzymes microbicides ou des protéines du complément [90].

#### b. Composés associés aux cellules

Les cellules épithéliales vaginales et exocervicales expriment à leur surface les récepteurs Toll-Like (TLR) 1, 2, 3, 5 et 6, alors que les cellules endocervicales n'expriment pas TLR 6 et que les cellules utérines expriment TLR 1 à 9 [191]. Chaque type de TLR est capable de reconnaître différents types de pathogènes spécifiquement. La présence de TLR sur ces cellules leur permet de détecter précocement la présence d'un large panel de pathogènes et d'alerter les acteurs de l'immunité innée et adaptative [191]. En effet, l'activation due à une reconnaissance par le TLR induit la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales (IL-6, IL-8, SDF-1), ainsi que l'activation des cellules immunitaires résidentes de la muqueuse [191].

#### c. Composés sécrétés après induction

Lors d'une inflammation ou d'une infection microbienne de la muqueuse génitale féminine, un environnement cytokinique pro-inflammatoire est mis en place par les cellules épithéliales, induisant le recrutement des cellules de l'immunité [LT, neutrophiles, cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)] à la surface de la muqueuse [167,198]. Les cellules épithéliales du tractus génital féminin produisent de façon constitutive, et suite à une stimulation, des ligands naturels de CCR5 (MIP-1 $\alpha$  et - $\beta$  et RANTES) et des Syndécans-1 et -4 [98,191]. Le recrutement des pDC est régulé notamment par la sécrétion de CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), suggérant un rôle important de cette cytokine dans l'immunité de la muqueuse génitale [16,198]. Les pDC retrouvées dans la muqueuse après infection expriment les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  et MIP-1 $\alpha$  et - $\beta$ , qui vont attirer les LT CD4 CCR5<sup>+</sup> [167].

De plus, les cellules épithéliales génitales féminines sont capables de produire des interférons qui ont des effets antiprolifératifs, immuno-modulateurs et antiviraux : IFN type 1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ), IFN type 2 ( $\gamma$ ), IFN type 3 ( $\lambda$  ou IL28/29) [191]. Les IFN-1 entravent la réplication de HIV via de nombreux mécanismes, notamment l'induction de la protéine cellulaire antivirale APOBEC-3G [191]. Les IFN-2 semblent avoir un effet inhibiteur sur la réplication de HIV dans les monocytes, les macrophages et les lymphocytes, mais certaines études lui ont à l'inverse attribué un effet stimulateur sur cette réplication [191]. Les IFN-3 ont également des propriétés antivirales ; ils semblent notamment capables d'empêcher l'infection des macrophages en stimulant la production de ligands de CCR5, de protéines cellulaires antivirales (APOBEC-3G/3F) et d'IFN-1 [191].

Le contact des muqueuses génitales féminines avec le sperme induit également la sécrétion de cytokines et chimiokines diverses qui vont provoquer des réactions immunitaires. Ainsi, le contact du plasma séminal avec la muqueuse vaginale lors d'un rapport hétérosexuel induit la sécrétion de CCL20 par les cellules épithéliales, ce qui entraîne le recrutement de LC et facilite la dissémination du virus dans l'organisme [16,198,199].

## ***B. Le tractus génital masculin***

Le sperme a été très étudié pour ses caractéristiques de fertilité. Un homme sain peut éjaculer entre 2 et 5 ml de sperme contenant entre 75 et 100 millions de spermatozoïdes par ml. Ce fluide contient également des NSMC, principalement composées de polynucléaires neutrophiles, mais aussi de macrophages, de LT et de cellules épithéliales du tractus génital masculin [16].

Dans le sperme d'un homme infecté par HIV, le virus peut être retrouvé sous deux formes : virus libre, dans le plasma séminal, ou virus associé aux cellules, dans les NSMC [16,162,163]. Plus la charge virale dans le sperme est élevée, plus le risque d'infection lors d'un rapport hétérosexuel non protégé est élevé [16,162,200]. Il peut exister une augmentation intermittente de la virémie séminale malgré la prise d'un traitement antirétroviral efficace avec une charge virale plasmatique indétectable [157,161,162,201].

### **1. Compartiment cellulaire**

Le compartiment cellulaire du sperme contient des spermatozoïdes, des cellules germinales, des cellules épithéliales et des NSMC. Les NSMC sont majoritairement composées de macrophages, notamment chez les patients infectés par HIV dont le sperme contient plus de leucocytes que le sperme de sujets sains [202]. Diverses études ont montré la présence de provirus dans les NSMC chez plus de 50% des patients, indépendamment du stade d'infection [163,202]. De plus, il a été montré

en 1988 que 0.01% à 5% des cellules mononucléées du sperme étaient infectées par HIV [203]. Lors d'une contamination hétérosexuelle de l'homme vers la femme, il semble que le virus associé aux cellules (NSMC) soit préférentiellement transmis par rapport au virus libre [204]. En effet, lors d'un contact sexuel, les NSMC sont capables d'établir des contacts cellule-cellule avec les cellules épithéliales génitales féminines et transmettre le virus aux cellules de la muqueuse, via une synapse virologique établie entre ces deux types cellulaires [205].

Le rôle des spermatozoïdes dans l'infection par HIV a été largement controversé (pour une revue, voir [157]). Il est désormais admis que les spermatozoïdes ne sont pas des cellules dans lesquelles HIV peut se répliquer. En effet la plupart des études montrent une absence d'ADN proviral dans les spermatozoïdes [9,163,165,202]. Néanmoins la présence d'ADN proviral a été montrée dans une sous-population de spermatozoïdes éjaculés montrant une morphologie anormale et un noyau fragmenté [206]; le phénomène semble être dû à une contamination par des leucocytes infectés, ou encore à une capture non spécifique du génome viral par les spermatozoïdes et une transcription inverse spontanée, ce qui déclencherait l'activation de nucléases ; ces spermatozoïdes sont voués à être détruits [157,163,165]. Plusieurs récepteurs de HIV, dont CCR5, le récepteur GalAAG (récepteur proche du GalCer) ou le MR, sont exprimés par les spermatozoïdes, ce qui va dans le sens de certaines études *in vitro* montrant que le virus est capable de s'attacher à la surface des spermatozoïdes et d'être transporté puis transmis à des cellules permissives (LT, DC) à leur contact, même si cela n'a pas encore été démontré *in vivo* [157,165]. La fixation du virus aux récepteurs exprimés par les spermatozoïdes, notamment le GalAAG, est inhibée par la présence du plasma séminal, ce qui implique que HIV ne se lie pas aux spermatozoïdes éjaculés [157]. Les spermatozoïdes sont capables de capturer spontanément de l'ARN ou de l'ADN en absence de plasma séminal, de rétro-transcrire l'ARN en ADNc et parfois de l'intégrer dans son génome. Par la suite les spermatozoïdes peuvent transmettre cet ADNc à l'embryon lors d'une fécondation *in vitro* [157]. Cependant la capacité des spermatozoïdes à être infectés de façon productive ou non par HIV et leur rôle potentiel dans la transmission de HIV par voie sexuelle restent à élucider.

## 2. Compartiment plasmatique

Le plasma séminal (PS) correspond au compartiment non cellulaire du sperme, dans lequel le virus est retrouvé sous forme libre. C'est un fluide riche en protéines contenant de nombreuses enzymes, des cytokines, des facteurs du complément, des prostaglandines, de la fibronectine, de forts taux d'ions zinc, etc., connus pour se lier à la protéine gp120 de HIV, [16,207,208]. Malgré les incertitudes actuelles concernant les mécanismes précoces impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV, le PS joue un rôle important dans cette transmission, notamment en induisant

un certain nombre de changements au niveau de la muqueuse génitale féminine pouvant favoriser la transmission du virus. En effet, le PS neutralise le pH acide de la muqueuse génitale féminine, et par conséquent son effet protecteur vis-à-vis des pathogènes [16,185]. De plus, il stimule la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales [198,209], et induit l'infiltration de leucocytes et le recrutement de LC par la sécrétion de CCL20 [199,210].

Parallèlement Sabatté et coll. ont montré que le PS inhibe efficacement la capture et la transmission de HIV depuis les DC et les cellules exprimant le récepteur DC-SIGN, vers les LT CD4 [210]. De plus, le plasma séminal contient de la fibronectine, glycoprotéine homo-dimérique de 440kDa impliquée dans l'adhésion à la matrice extracellulaire. La fibronectine lie spécifiquement les protéines gp120 et gp160 de HIV, inhibe sa fixation au récepteur CD4 et neutralise donc l'infection des cellules exprimant cette molécule [207].

Le PS contient également un fort taux de TGF- $\beta$ 1, protéine pro-inflammatoire, qui va également avoir un rôle immunosuppresseur dans la préparation du tractus génital féminin à la conception (fécondation). Il a été observé que le taux de TGF- $\beta$ 1 dans le sperme d'hommes infectés par HIV différait, en fonction du stade d'avancement de la maladie (taux plus élevé chez les patients infectés chroniquement, comparé aux primo-infections). Cela suggère que ce facteur peut induire des réponses différentes dans le tractus génital féminin [191,211].

Le PS peut donc jouer un rôle soit facilitateur soit inhibiteur de l'infection par HIV ; des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle exact du PS dans la transmission HIV, ainsi que les conditions dans lesquelles il s'exerce.

### *C. Interactions muqueuses – sperme – HIV*

Initialement, les études sur la transmission hétérosexuelle ont été réalisées sur les modèles de singes macaques rhésus infectés par SIV (virus de l'immunodéficience simienne), un bon modèle d'étude pour l'amplification du virus et sa dissémination à partir du site d'infection vers les tissus lymphoïdes et la progression de la maladie (déclin des LT CD4) [16]. Il a notamment été démontré sur ce modèle que le virus inoculé au niveau vaginal est capable d'infecter un petit nombre de cellules de façon productive dans la muqueuse cervico-vaginale pendant les 3 premiers jours d'infection. Cette étude a également montré une dissémination rapide d'une petite proportion de particules de SIV libre, ou de cellules infectées, dans l'organisme de l'animal, de la porte d'entrée (muqueuse cervico-vaginale) vers les tissus lymphatiques [212].

La transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme étant le mode de transmission majoritaire de HIV, le sperme est donc le vecteur principal de la dissémination de ce virus. Lors d'un rapport hétérosexuel non protégé, le sperme est déposé au niveau de la voûte vaginale, proche du col de l'utérus, les spermatozoïdes migrent ensuite dans le canal de l'endocol [16].

Les événements menant à l'infection par HIV par voie hétérosexuelle interviennent peu de temps après le contact de la muqueuse génitale féminine avec le sperme infecté [16,196]. En effet, Hu et coll., ont montré qu'un lavage vaginal effectué sur un macaque femelle peu de temps après contact avec SIV n'empêchait pas l'infection de l'animal [213]. De plus, Maher et coll. ont montré que les leucocytes contenus dans le tissu cervical, qui sont localisés au niveau de la sous-muqueuse, à proximité immédiate de l'épithélium endocervical, sont infectés 4 à 6 jours après mise en contact avec le virus seul (isolat primaire de PBMC) [107]. Des résultats similaires ont été obtenus par Miller et coll. en 2005, suggérant que la dissémination du virus intervient suite à l'infection productive de cellules immunitaires présentes dans la muqueuse cervico-vaginale [212]. Par ailleurs, Maher et coll. ont observé par microscopie confocale que les NSMC infectées se fixent sur l'épithélium stratifié de l'exocol alors que, au niveau de l'endocol, les cellules restent pour la plupart séquestrées dans le mucus sécrété par les cellules de l'épithélium génital [107]. Les particules virales libres semblent quant à elles majoritairement bloquées dans le mucus endocervical, hypothèse appuyée par l'étude de Miller et coll. [212], même si quelques virions sont retrouvés dans ou sous les muqueuses endocervicales, et pénètrent dans la muqueuse de l'exocol [107]. Au niveau de la zone de transition entre l'exocol et l'endocol, qui sécrète moins de mucus, la fixation et la pénétration du virus dans la surface épithéliale est plus efficace que dans l'endocol [107].

De nombreux composants du sperme peuvent influencer positivement ou négativement l'infection par HIV. Le sperme contient notamment des amines basiques (e.g. spermine, spermidine, cadaverine), initialement présentes pour protéger les spermatozoïdes de l'acidité du tractus vaginal et qui protègent également les particules virales HIV [185,191]. Münch et coll. ont démontré que des fragments d'une enzyme prostatique (PAP : Prostatic Acidic Phosphatase) présents dans PS facilitent l'infection par HIV. Ces peptides agissent en formant des fibrilles amyloïdes qui capturent les particules virales et facilitent l'attachement du virion à la cellule et la fusion des membranes [14]. Ces fibrilles amyloïdes sont appelées SEVI (Semen-derived Enhancer of Virus Infection) et peuvent augmenter jusqu'à 5 fois le pouvoir infectieux de HIV [14].

Le PS favorise les contacts entre les NSMC et les cellules épithéliales génitales féminines par l'action de la prostaglandine qui est retrouvée en forte concentration dans le sperme [205]. La réponse inflammatoire observée après contact du PS avec la muqueuse est dépendante, en termes de composition des cytokines produites et d'importance de la réponse, du type de muqueuse

(endocervicale, exocervicale, vaginale) et de la concentration de PS en contact avec la muqueuse [214]. Ainsi, Sharkley et coll. ont montré que les cellules de la muqueuse exocervicale sont particulièrement sensibles à l'activation par le PS puisqu'elles produisent un mélange de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (e.g. MCP-1, IL-6, IL-8, GM-CSF) en plus grande quantité que les cellules des muqueuses vaginales et endocervicales [209].

Denison et coll. ont montré que le PS stimule la sécrétion par les cellules cervicales de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 et inhibe la sécrétion de cytokines anti-inflammatoire SLPI [208]. Parallèlement, ils ont montré que le PS peut soit stimuler soit inhiber la sécrétion d'IL-8 par les cellules immunitaires (PBMC) en fonction de la concentration de PS utilisée, et stimule la sécrétion de cette cytokine, d'IL-10 et de SLPI par les monocytes [208]. De plus, le contact du PS avec la muqueuse génitale féminine induit la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire par le biais de la production de cytokines GM-CSF, IL-6 et MCP-1, et de la migration de DC et de macrophages, au niveau du stroma endométrial [167,214]. Des leucocytes sont également recrutés au niveau de l'épithélium cervical après contact entre le PS et la muqueuse génitale féminine, suite à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, IL-6 et MCP-1) [167,214]. Le composant principal du sperme, la prostaglandine E<sub>2</sub>, inhibe l'action du système immunitaire présent au niveau de la muqueuse génitale féminine afin de préserver la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin. La réponse anti-inflammatoire induite par le PS et son composant principal, permet donc la préservation de la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin, initialement hostile, puis, grâce à son rôle pro-inflammatoire, il permet, *post-coït*, d'attirer les neutrophiles dans la muqueuse génitale féminine, qui vont phagocyter les spermatozoïdes non impliqués dans la fertilisation [208].

Il a été observé depuis de nombreuses années que la transmission sexuelle de HIV est beaucoup plus efficace en présence de coinfection virale (e.g. HSV-2) ou bactérienne (e.g. *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* - syphilis) [162,167,169,184,195,202,215]. Les coinfections peuvent causer une cervicite (inflammation du col de l'utérus due à une infection virale, bactérienne ou parasitaire) ou encore des ulcérations, créant des brèches dans la barrière épithéliale génitale [167,184,191,200]. Si la muqueuse est inflammée, la pénétration de HIV est facilitée, ce qui favorise sa réplication ainsi que sa libération [191,216,217].

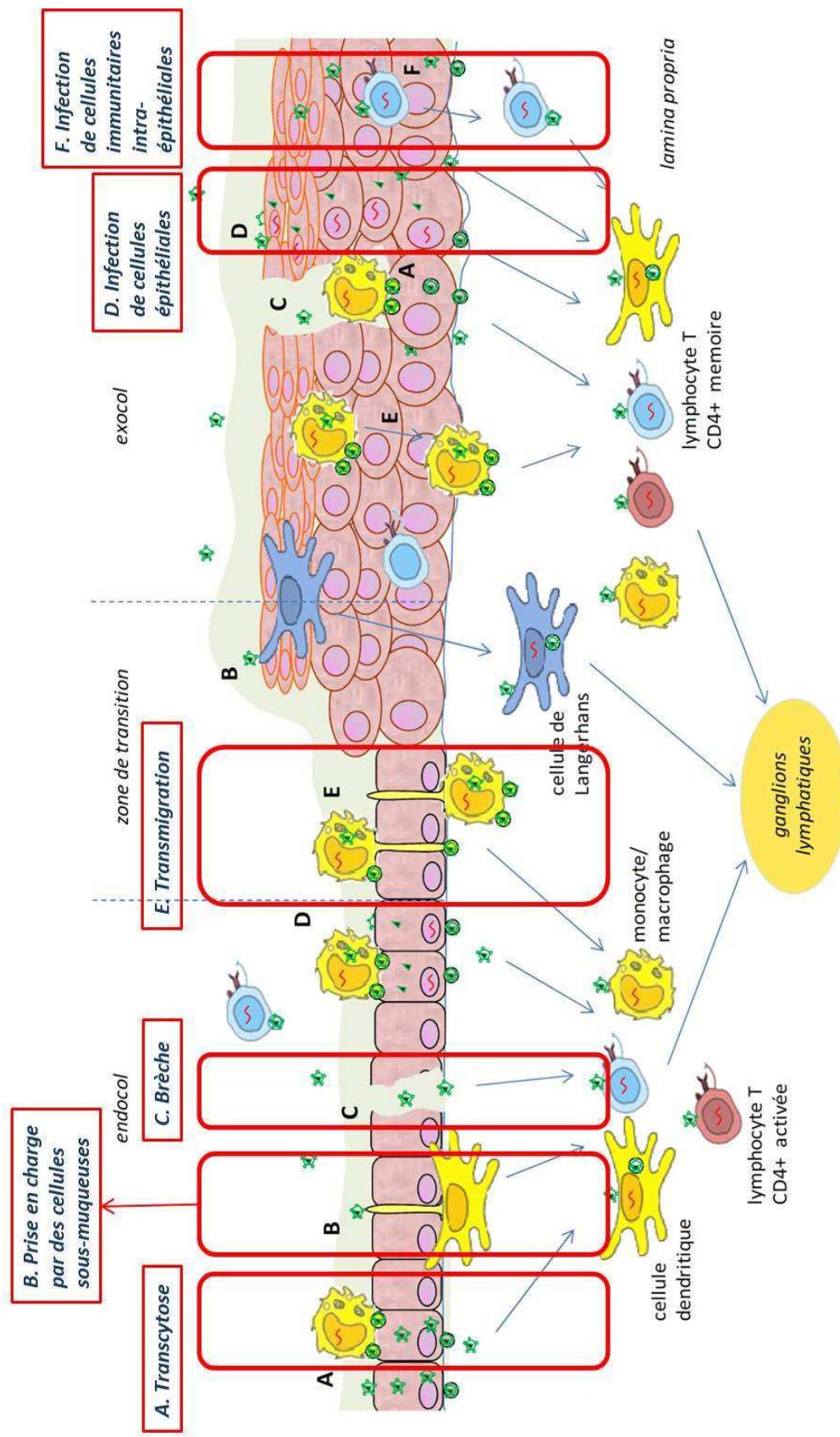
Lors d'une transmission hétérosexuelle, l'étude de l'infection d'une muqueuse par HIV se doit d'être replacée dans un contexte *in vivo*. Il faut prendre en compte les mécanismes d'entrée du virus au sein de la muqueuse ainsi que l'interaction entre les composants du sperme et la muqueuse, qui sont encore mal connus [185]. L'impact du sperme sur le pH de la muqueuse génitale féminine et



sur la sécrétion de molécules pro- ou anti-inflammatoires par les cellules épithéliales sont des facteurs importants à prendre en compte dans le développement d'hypothèses concernant la transmission hétérosexuelle de HIV par voie muqueuse.

## **V. Mécanismes de franchissement des muqueuses**

Les premières cibles de HIV lors de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme sont les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse et la sous muqueuse génitale féminine. Ce n'est que lorsque le virus est en présence de ces cellules, après avoir franchi les muqueuses, que l'infection devient possible. Il existe donc des mécanismes permettant au virus de franchir cette barrière. En effet, de nombreuses études montrent que les virions peuvent traverser ces muqueuses via différentes voies d'importances inégales (Figure 19) [15,167,191] : A. transcytose des particules virales libres à travers l'épithélium (Figure 19-A) [16,196] (Figure 19-C) ; B. prise en charge des virions par des cellules dendritiques ou infection des cellules immunitaires intra-épithéliales et sous-muqueuses (Figure 19-B et F) [105,218] ; C. brèches [219] ; D. infection des cellules épithéliales (Figure 19-D) [220] ; E. transmigration des leucocytes séminaux (Figure 19-E) [221,222].



**Figure 19:** Les différentes voies de passage de HIV à travers la barrière muqueuse génitale féminine.

Adapté de Lawrence et al. [188].

## *A. Transcytose*

La transcytose est le passage du virus à travers les cellules épithéliales sans induire de fusion des membranes, ni d'infection productive de ces cellules (Figure 19-A). Deux équipes ont montré en 1997 et en 2007 que la transcytose des virions est possible dans des cellules épithéliales génitales immortalisées, mais aussi dans des cellules primaires, même si ce mode de passage n'a pas été démontré dans des explants [96,196].

Le transcytose correspond au passage de virions à travers la muqueuse, de la face apicale vers la face basale. Ce mode de transmission montre une efficacité très faible, moins de 0.02% de la quantité de virus libre initiale traversant la barrière muqueuse par cette voie, ce qui fait de la muqueuse génitale féminine une barrière efficace contre l'infection par HIV, même si le passage du virus libre à travers cette barrière reste possible [96].

Ce mode de transmission implique l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe avec des lectines telles que D (+) mannose et des galactosylcérébroside présents à la surface des cellules épithéliales de l'endomètre [223]. Deux études de 2007 ont montré que la transcytose de HIV est possible dans les muqueuses génitales féminines grâce à l'attachement de la boucle V3 de gp120 sur les récepteurs alternatifs de la famille des HSPG (notamment les Syndecans) présents au niveau de la membrane cellulaire [96,97]. Bobardt et coll. ont également montré que les corécepteurs CXCR4 et CCR5 facilitent l'entrée du virus dans les cellules et donc le transport du virus libre à travers les cellules épithéliales génitales, alors que les récepteurs CD4 et GalCer ne sont pas requis [96]. Cette équipe n'a en revanche trouvé aucune corrélation claire entre le tropisme des virus et l'efficacité de passage à travers la muqueuse génitale féminine par transcytose [96]. En revanche, l'équipe de Bomsel a montré en 2001 que gp41 est capable de se fixer au récepteur alternatif GalCer présent au niveau des radeaux lipidiques de la membrane des cellules épithéliales génitales féminines, et que cette fixation induit l'inhibition de la transcytose de HIV-1 dans ces cellules [93]. Aussi les mécanismes exacts impliqués dans la transcytose semblent impliquer divers récepteurs en fonction des modèles cellulaires et restent en partie à élucider.

Il est intéressant de noter qu'après leur libération au niveau basal les virions sont capables d'infecter des leucocytes et que les virus associés aux cellules ont une transcytose plus efficace que les particules virales libres [15,196].

## ***B. Prise en charge par et/ou infection des cellules immunitaires sous-muqueuses***

Les particules virales, libres ou associées aux cellules, qui sont capturées dans le mucus peuvent être prises en charge par les cellules immunitaires, notamment les LC, présentes dans la muqueuse ou le stroma (Figure 19-B) [15]. Ces LC peuvent internaliser les virions dans des vésicules d'endocytose, établissant ainsi un réservoir viral dans l'organisme, et transmettre ce virus, de façon optimisée, plusieurs jours après capture [15]. De même, les virions peuvent être captés par des LT CD4 intra-épithéliaux, ce qui induit une infection productive de ces cellules avec réplication du virus [15]. En effet, Hladik et coll. ont démontré, par visualisation en microscopie confocale et électronique, que lors du contact entre le virus et l'épithélium vaginal HIV infecte initialement et de façon productive les LT CD4 intra-épithéliaux et est internalisé rapidement par les LC. Cette internalisation concerne majoritairement les virus à tropisme R5 [15] et pourrait expliquer en partie la sélection à tropisme R5 observée lors d'une primo infection (cf. « sélection à tropisme R5 »).

Lors d'une transmission sexuelle, HIV est également capable d'infecter directement les cellules immunitaires présentes dans l'épithélium de la muqueuse génitale féminine (Figure 19-D). Patterson et coll. montrent que les deux corécepteurs de HIV sont exprimés par les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse génitale féminine et suggèrent que CCR5 est le corécepteur principal dans la muqueuse génitale féminine [195]. La présence de LT CD4 dans la muqueuse génitale féminine, et notamment de LT CD4 mémoires exprimant majoritairement le corécepteur CCR5, en font des cellules cibles principales pour l'infection par HIV lors d'un contact sexuel [78]. Les macrophages présents dans les muqueuses et les DC de l'épithélium vaginal sont également des cellules cibles de HIV et peuvent être infectées de façon productive, plus particulièrement par des virus à tropisme R5 [112,115,224]. De plus, Miller et coll. ont montré en 2005 dans un modèle *in vivo* (singe macaque rhésus) que SIV est capable d'infecter des cellules immunitaires (LT, macrophages, DC) présentes dans la muqueuse cervico-vaginale peu de temps après le contact viral, et de disséminer l'infection dans l'organisme [212]. L'infection de ces cellules par HIV permet sa réplication et sa dissémination dans la sous-muqueuse puis au niveau systémique, via le transport du virus aux ganglions lymphatiques où les LT et les LB vont être stimulés et activés [195].

## ***C. Brèches dans la muqueuse***

En cas d'infection microbienne (e.g. vaginose bactérienne), d'infection sexuellement transmissible (e.g. HSV), ou au cours d'un rapport sexuel, la muqueuse génitale féminine peut subir

des dommages physiques, qui induisent l'apparition de brèches au sein des couches de cellules épithéliales [16]. L'infection par HIV via une brèche est le mode de passage du virus le plus simple, le plus rapide et le plus efficace, le virus pouvant traverser directement la muqueuse pour accéder aux cellules immunitaires sous-muqueuses (Figure 19-C). Ces brèches apparaissent chez plus de 60% des femmes après un rapport sexuel, permettent au virus présent dans le sperme d'entrer en contact direct avec les leucocytes de la sous-muqueuse, et potentiellement de les infecter [16,219]. Ce mécanisme concerne principalement la transmission du virus libre.

#### *D. Infection des cellules épithéliales génitales*

Le rôle des cellules épithéliales génitales dans l'infection par HIV est assez controversé [115,169]. HIV peut pénétrer à travers la muqueuse génitale féminine soit par l'infection productive de cellules épithéliales basales et supra basales, soit en étant internalisé par ces cellules et séquestré dans des compartiments d'endocytose et dans le cytosol. Cette dernière voie de passage du virus à travers la barrière muqueuse induit la mise en place d'un réservoir viral, notamment au niveau de l'épithélium génital féminin [15].

Une des premières preuves de l'infection par HIV de cellules n'exprimant pas CD4, notamment les cellules épithéliales, a été publiée en 1990 par Ikeuchi et coll. [92]. Ces auteurs ont étudié l'infection de fibroblastes du prépuce, de cellules synoviales et de chondrocytes. Ils ont observé que ces cellules n'exprimant pas CD4 sont infectées par HIV et que cette infection n'est pas inhibée par l'utilisation d'anticorps anti-CD4. Par la suite, plusieurs études ont montré que HIV est capable d'infecter de façon productive les cellules épithéliales du tractus génital féminin. Cela suggère que les cellules épithéliales génitales féminines ont un rôle dans la mise en place de l'infection par HIV après un contact hétérosexuel [159,215,220,225]. Il a également été démontré que les cellules épithéliales génitales, et notamment les cellules épithéliales exocervicales et urogénitales peuvent séquestrer le virus puis le transmettre quelques jours plus tard aux PBMC [169,170].

Plusieurs études ont montré la présence de protéines capables de fixer HIV à la surface des cellules épithéliales génitales, dont le lactosylcéramide sulfaté et le galactosylcéramide (GalCer) qui fixent HIV via gp120 et favorisent la transcytose [13,95,169,191,196]. D'autres récepteurs semblent impliqués dans l'attachement et l'infection de cellules épithéliales par HIV, notamment les récepteurs HSPG [96,170,191]. En 2007, Stoddard et coll. ont montré que le récepteur gp340, exprimé par les cellules épithéliales cervicales et vaginales, peut également se lier spécifiquement à l'enveloppe de HIV et induire le passage du virus à travers l'épithélium génital, en stabilisant le virus,

permettant ainsi au virus infectieux d'entrer en contact avec les leucocytes sensibles à l'infection [101,191]. L'équipe de Maher a montré que l'intégrine  $\beta 1$ , exprimée par les cellules épithéliales cervicales, peut, dans certains cas, fixer les virions préalablement recouvert de fibronectine, présente dans le sperme [107].

Parallèlement à cela, plusieurs études ont tenté de détecter l'expression des corécepteurs de HIV à la surface des cellules épithéliales génitales, avec des résultats contradictoires : Dezzutti et coll. n'ont détecté aucune expression de CCR5 ou de CXCR4 à la surface de ces cellules [169], alors que Yeaman et coll. ont conclu qu'elles expriment CCR5 et pas CXCR4 [95]. L'étude menée par Hu et coll. a montré pour sa part que les cellules de la muqueuse cervico-vaginale expriment les corécepteurs CXCR4 et CCR5, et qu'ils sont les corécepteurs principaux utilisés par HIV pour infecter ces cellules [110]. Enfin, une étude conduite au sein du laboratoire en 2005 a identifié la présence de CXCR4 à la surface de ces cellules mais pas celle de CCR5 [153]. Les différences d'expression obtenues peuvent venir du modèle utilisé pour ces études. En effet, en fonction de l'épithélium étudié (endocol, vagin, exocol) les cellules n'expriment pas toujours les mêmes corécepteurs, et ces cellules peuvent donc intervenir différemment lors de la transmission sexuelle [95,110,153,169]. De plus, l'expression des corécepteurs de HIV peut également différer selon s'il s'agit de lignées cellulaires ou d'explants ; de même des différences peuvent être observées entre différents explants.

### **E. Transmigration**

La transmigration, passage du virus associé aux cellules présent dans le sperme à travers la muqueuse génitale, peut être impliquée dans la transmission sexuelle (Figure 19-E). Les cellules du sperme infectées s'infiltrèrent entre les cellules épithéliales dans la muqueuse génitale féminine en libérant des particules virales de manière polarisée, en direction de la sous-muqueuse [221,226]. Ce mode de transmission actif est efficace à environ 1 à 3% en fonction de l'environnement inflammatoire. Cela a été démontré *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* chez la souris et chez le singe [221,222,226–228].

Des molécules spécifiques présentes à la surface des cellules épithéliales et des monocytes semblent intervenir dans la transmigration. En effet, M. Carreno et coll. ont montré que l'infection de MDM induit l'augmentation de l'expression de CD11a à leur surface [221]. Ils ont également montré que CD11a, largement impliqué dans la transmission de HIV, est fortement impliqué dans la transmigration à travers la muqueuse endocervicale. Celle-ci opère en interaction avec deux de ses ligands, ICAM-2 et ICAM-3, molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endocervicales

après stimulation par un environnement pro-inflammatoire [221]. La transmigration semble utiliser un mécanisme indépendant de gp120 et des corécepteurs principaux de HIV (CXCR4 et CCR5) [221].

De nombreuses études concernant la transmission hétérosexuelle de HIV-1 ont été menées sur les cellules épithéliales vaginales et exocervicales, qui sont facilement accessibles au virus lors d'un rapport sexuel. Cependant peu d'études ont investigué le rôle des cellules épithéliales endocervicales dans la transmission hétérosexuelle, étant donné que cette muqueuse a longtemps été considérée comme une zone difficilement accessible au virus. Pourtant, des traces de sperme peuvent être retrouvées dans la muqueuse utérine plusieurs jours après un rapport sexuel. De plus, cette muqueuse peut être particulièrement sensible à la transmission de HIV de par sa structure en monocouche plus facile à traverser et souvent siège de brèches. Les cellule semblent donc jouer un rôle important dans la transmission du virus de l'homme vers la femme [127,167,229].

# Modélisation des interactions virus-cellules

## **I. Marquages fluorescents et techniques de visualisation**

Au fil des années de nombreuses techniques ont été développées afin d'étudier le comportement du virus, et notamment des techniques de visualisation qui ont connu de forts développements depuis les 3 dernières décennies. Diverses techniques de visualisation existent, de l'hybridation *in situ* à la microscopie électronique en passant par les techniques de microscopie à épi-fluorescence et de microscopie confocale [65,230–232]. La visualisation directe des interactions entre le virus et les cellules a permis à la communauté scientifique de comprendre nombre de mécanismes. Aussi la maîtrise de ces outils est primordiale pour déterminer certains mécanismes non élucidés actuellement, notamment au niveau de la transmission sexuelle de HIV.

### ***A. Techniques de visualisation microscopique en fluorescence***

La microscopie est une technique permettant d'observer un échantillon de petite taille et d'étudier son comportement dans le temps et l'espace. La résolution, capacité d'un microscope à distinguer deux points à proximité, permet d'observer une structure particulière dans l'échantillon étudié et dépend du type de microscope et de marquage utilisés. Les techniques microscopiques de détection de la fluorescence sont largement utilisées en virologie ; les plus couramment utilisées sont décrites dans le paragraphe ci-dessous [230–232].

#### **1. Microscopie à épi-fluorescence**

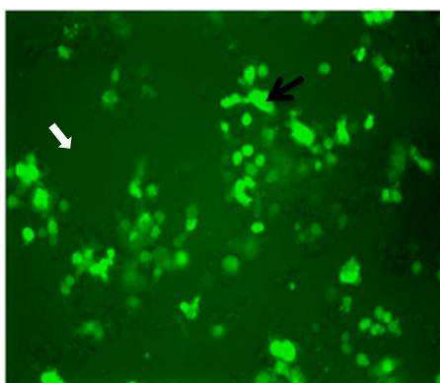
La microscopie à épi-fluorescence est la technique de microscopie la plus utilisée en biologie. Cette technique permet d'étudier et de localiser des composants et structures cellulaires ou virales en utilisant des marqueurs spécifiques. De plus, la microscopie à fluorescence permet d'observer les composants ou structures d'intérêt directement à l'intérieur de la cellule vivante. Le microscope à épi-fluorescence est le plus simple d'utilisation, le plus abordable et permet de visualiser des particules virales ou des cellules infectées par HIV (Figure 20) [230]. Ainsi l'équipe de Müller et coll. a utilisé cette technique afin de visualiser, dans différents types cellulaires, la fluorescence émise par les virus chimériques qu'ils ont construits (cf. « outils virologiques : virus chimériques ») et leur capacité à induire des syncytia dans les cellules infectées [233]. Jolly et coll. ont utilisé cette



technique pour étudier l'accumulation du récepteur CD4 et des particules virales au niveau de la synapse virologique lors d'une transmission cellule-cellule [234,235].

En revanche, cette technique n'est pas assez sensible pour détecter et suivre des particules virales, si celles-ci sont peu fluorescentes, à cause du bruit de fond trop intense. En effet, avec ce type de microscope, les fluorochromes présents en dehors du plan de mise au point sont également excités par le microscope, et apporte ainsi une fluorescence parasite non spécifique du champ observé (Figure 20) [236]. De plus, la résolution des microscopes à épi-fluorescence étant trop faible, ils ne permettent pas de visualiser en détail des structures très petites (inférieures à 200-300 nm en latéral et 500-700 nm en axial), à cause de la diffraction de la lumière [232].

Ainsi, la microscopie à épi-fluorescence n'est pas en mesure d'éliminer la fluorescence non spécifique émise par les échantillons sur des plans de mise au point différents de celui observé et ne permet pas de reconstituer des images en 3D, sans effectuer des coupes de l'échantillon étudié [230,232].



**Figure 20: Cellules dendritiques reportrices infectées par HIV-1 visualisées par microscopie à épi-fluorescence.**

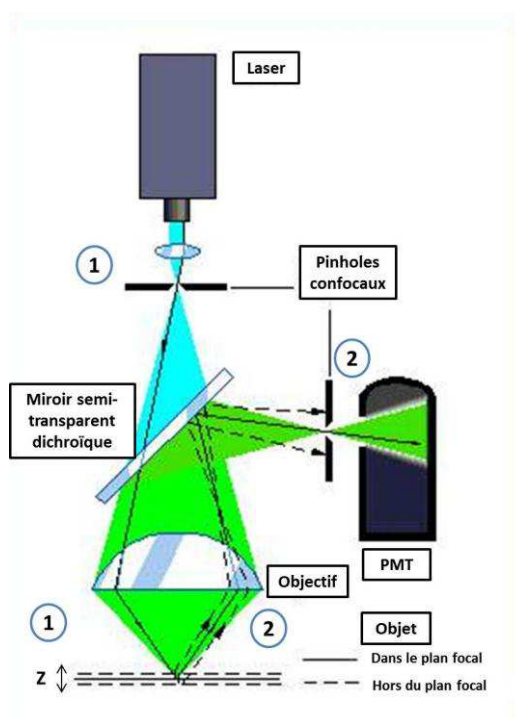
Adapté de Huang et al. [237].

*Les cellules reportrices sont des cellules fluorescentes eGFP. Flèche noire : Cellules infectées exprimant l'eGFP.  
Flèche blanche : Bruit de fond.*

## 2. Microscopie confocale

La microscopie confocale et la microscopie multi-photons sont des techniques de microscopie à fluorescence qui permettent d'augmenter la résolution limitée par la diffraction de la lumière et d'obtenir une vision spatiale de l'objet d'étude [232]. La microscopie confocale combine l'utilisation d'un laser pour exciter la fluorescence avec celle d'un diaphragme (pinhole) qui focalise la lumière émise avant qu'elle passe par les miroirs dichroïques utilisés pour détecter la fluorescence

émise (Figure 21) [232,236]. La microscopie confocale permet d'éliminer de l'image la fluorescence non spécifique émise hors du plan focal et de visualiser l'intérieur des cellules [236]. Elle permet ainsi de réaliser des sections optiques permettant de reconstituer des images en 3 dimensions. Cette technique, en éliminant un maximum de bruit de fond, d'auto-fluorescence indésirable ou de fluorescence non spécifique, permet de visualiser la position des objets d'études, à l'intérieur des cellules et dans la profondeur des couches épithéliales (coupes en Z) [230,236]. Il est également possible de segmenter les fluorescences (acquisition séquentielle) afin d'optimiser le signal obtenu, en éliminant tout risque de chevauchement des spectres des fluorochromes [65,113,230,232]. La microscopie confocale comporte également une forte résolution temporelle permettant l'utilisation d'imagerie confocale en temps réel [65,230].

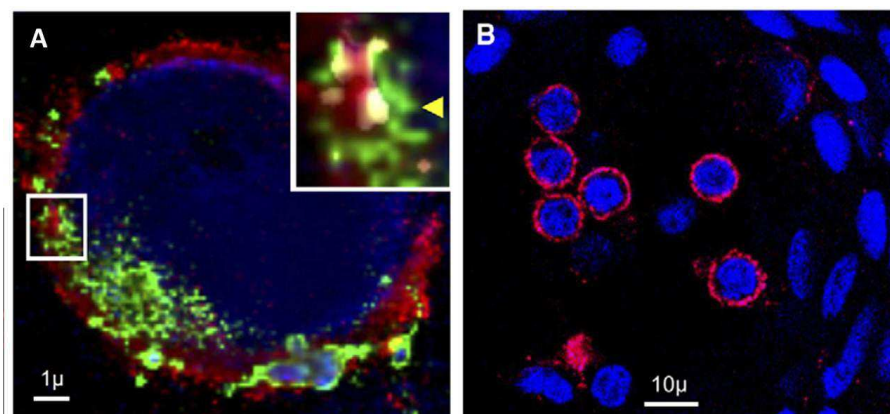


**Figure 21: Principe de la microscopie confocale.**

Adapté de <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/clsm/clsm2.html>

*Le rayon laser passe à travers le pinhole d'excitation (1). Il va ainsi former un point source qui excite et illumine le fluorochrome (1). Le point d'illumination est très précis, il se déplace dans l'échantillon sur l'axe X-Y. La lumière émise par le fluorochrome traverse un miroir et arrive au détecteur photomultiplicateur (PMT) (2). Le deuxième pinhole présent devant le PMT permet de sélectionner la lumière d'émission provenant d'un seul plan focal (celui observé) et donc d'éliminer le bruit de fond (2). Il est également possible d'obtenir une série de coupes optiques suivant l'axe X-Z grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique) non représentée dans ce schéma.*

La microscopie confocale permet de visualiser par fluorescence l'infection de cellules par HIV. Soit le virus modifié émet une fluorescence directe (virus chimériques ou pseudovirus exprimant un fluorochrome), soit le virus est marqué par une fluorescence indirecte (cf. « outils virologiques ») [236]. Dans une étude réalisée en 2007, Hladik et coll. ont utilisé la technique de microscopie confocale afin de visualiser l'infection de cellules immunitaires au sein de la couche épithéliale vaginale, ainsi que la position du virus dans les cellules (cytoplasme, membrane, noyau). Pour cela, ils ont détecté la fluorescence émise par un pseudovirus GFP (fusionnée à la protéine virale Vpr) et certains récepteurs membranaires des LT CD4 et des LC (Figure 22) [113]. L'équipe de Bélec a montré par microscopie confocale la présence de virus HIV dans le cytoplasme de cellules épithéliales endocervicale, en conditions inflammatoires [221]. L'équipe de Vanham a, quant à elle, utilisé la microscopie confocale afin de visualiser la transmigration de cellules immunitaires (PBMC) infectées à travers un modèle *in vitro* de muqueuse génitale féminine, par marquage des cellules immunitaires [187].



**Figure 22:** Visualisation par microscopie confocale de cellules infectées par HIV.

Adapté de Hladik et al. [113]

*A : Particules virales entrant dans le cytoplasme de LT CD4. B : Clusters de virions attachés aux LT CD4 dans l'épithélium vaginal. Vert : Fluorescence émise par les pseudovirus HIV-GFP-Vpr. Rouge : marquage CD4. Jaune : co-expression de CD4 cellulaire et de la GFP de HIV. Bleu : marquage nucléaire. Flèche jaune, dans l'encadré : zone d'entrée du virus.*

La microscopie confocale présente cependant quelques limites : difficulté d'observer des cellules vivantes (induction de dommages irréversibles au niveau du métabolisme cellulaire, due au laser), « photobleaching » (perte de la fluorescence émise par le fluorochrome), résolution trop faible

pour visualiser la structure des particules virales HIV (0,2  $\mu\text{m}$  en latéral et 0,4  $\mu\text{m}$  en axial) [236]. Malgré ces limites, concernant notamment l'imagerie en temps réel, plusieurs équipes ont utilisé la technique de microscopie confocale combinée à une technique d'imagerie en temps réel, afin de visualiser l'assemblage de HIV au niveau de la membrane plasmique de cellules hôtes et le transfert cellule-cellule [65,238,239].

Ainsi, la microscopie confocale est une technique microscopique de détection de la fluorescence permettant d'obtenir des images en 3 dimensions (reconstruction à partir des coupes virtuelles en Z obtenues) et en temps réel, de haute résolution (0,2  $\mu\text{m}$  en latéral et 0,4  $\mu\text{m}$  en axial) et d'une grande netteté (grâce à l'élimination du bruit de fond). Elle permet l'utilisation de divers types d'outils virologiques et cellulaires et de détecter une large gamme de fluorochromes classiques dans tout le spectre, de l'UV (ultraviolet) au rouge lointain [230,232].

### 3. Imagerie en temps réel

L'imagerie en temps réel permet de suivre dans le temps le comportement de particules virales marquées par un fluorochrome en utilisant, entre autres, les techniques de microscopie décrites précédemment. L'imagerie en temps réel requiert deux conditions : une résolution temporelle assez forte pour enregistrer les dynamiques observées dans les cellules, et des marquages spécifiques de l'objet à visualiser (e.g.) [232].

La première expérience d'imagerie en temps réel sur cellules vivantes a été réalisée en 1981, à partir de complexes récepteur-LDL (Low Density Lipids) [231]. En 1989 était réalisée la première visualisation en temps réel de la fusion et du bourgeonnement d'un virus enveloppé dans une cellule vivante. Les premières vidéo-microscopies à fluorescence suivant un virus unique dans une cellule vivante ont été réalisées entre 1990 et 1992 sur le virus de la grippe [231]. Dès lors, les études se sont multipliées, à mesure que les techniques de visualisation se développaient. Ainsi, en 2006 la première expérience de visualisation en temps réel d'un virus dans un modèle animal vivant a permis de visualiser le système vasculaires des modèles animaux étudiés (souris et embryon de poulet) [240].

Sur le principe de cette technique, il est possible de suivre une particule virale unique ou des composants viraux à l'intérieur de cellules vivantes. Pour cela il faut utiliser un microscope à fluorescence avec une forte résolution et doté d'une caméra permettant de suivre l'objet à étudier dans le temps, afin de détecter un virus unique ou des composants viraux et ainsi de les différencier d'autres composants intracellulaires. Cette technique nécessite de marquer le virus et les structures cellulaires par un anticorps portant un fluorochrome, sans induire de toxicité, ou l'utilisation de virus

chimériques exprimant des protéines de fusion fluorescentes [231,238,241]. Cette technique puissante permet de visualiser les mécanismes d'entrée du virus dans une cellule ainsi que ses mouvements dans la cellule, le comportement des structures de la cellule au contact du virus, mais aussi de détecter le clivage de certaines protéines virales [231,238]. La première expérience d'imagerie en temps réel concernant HIV a été réalisée en 2002 par l'équipe de Hope, grâce au suivi d'un pseudovirus exprimant la protéine virale Vpr fusionnée à la GFP [61]. L'imagerie en temps réel a également permis à l'équipe de Daecke de montrer que le mécanisme d'entrée principal de HIV est la fusion et que certains virions peuvent infecter des cellules en utilisant une voie d'endocytose clathrine-dépendante [242]. D'autres auteurs ont visualisé la transmission dynamique de HIV de cellule à cellule [238,241].

#### 4. Autres techniques de visualisation

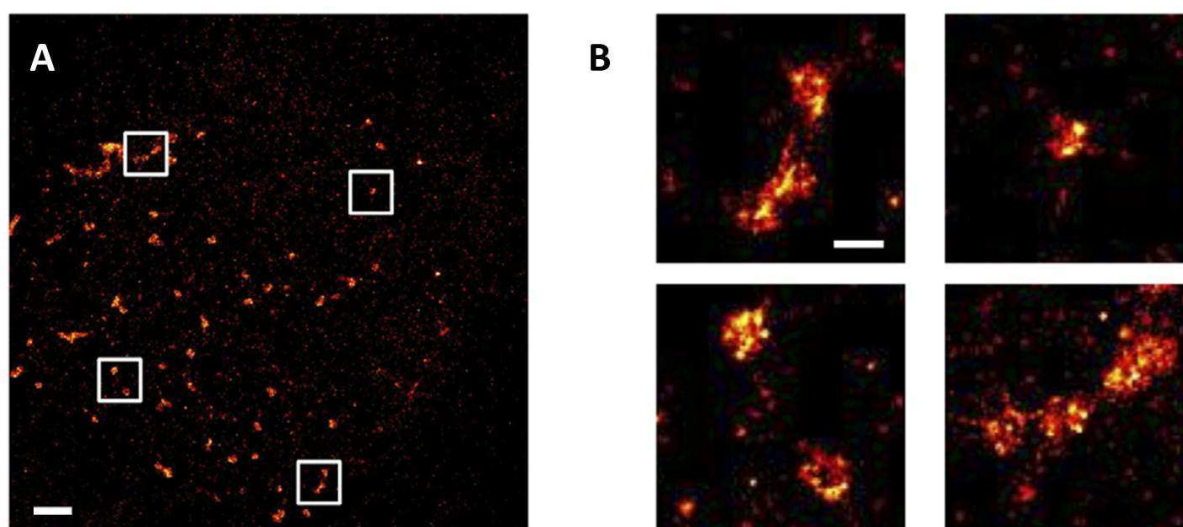
Les techniques classiques de détection de la fluorescence ne permettant pas de détecter des détails structuraux au-dessous d'une certaine résolution, des techniques à haute résolution ont donc été développées. Ces techniques permettent d'outrepasser les limites de résolution en évitant les problèmes de diffraction de la lumière, en partie en utilisant des fluorochromes spécifiques, photophysiques ou photochimiques [65,231,232].

Les techniques de microscopie à haute résolution telles que la STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) (Figure 23) et la STED (STimulated Emission Depletion) permettent de localiser et d'analyser des molécules et structures fluorescentes avec une résolution inférieure à la limite de diffraction [231,232,243]. D'autres techniques de visualisation de la fluorescence à haute résolution ont été développées, telles que la RESOLFT (Reversible Saturable Optically Linear Fluorescence Transition), la SSIM (Saturated Structured-Illumination Microscopy), le TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), la PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) ou la FPALM (Fluorescence PALM) [231,232,236]. Toutes ces techniques microscopiques ont été développées selon des principes différents et sont séparées en deux classes celles utilisant une approche d'excitation du modèle (STED, SSIM, RESOLFT), et celles utilisant une approche de localisation d'une molécule unique (STORM, TIRF, PALM, FPALM) (Figure 23) [65,232,236].

La STED et la RESOLFT sont des techniques de visualisation à haute résolution ayant pour principe « d'éteindre » la fluorescence présente autour du point focal du laser principal, avant que celle-ci soit émise. Cela permet de focaliser la détection de la fluorescence très spécifiquement sur le point visé [232]. La SSIM quant à elle utilise la saturation de fluorescence émise après des pics sinusoïdaux de forte excitation pour la rendre plate, alors que la fluorescence émise dans les

« vallées » du pattern d'excitation sinusoïdale est positive. Une image de haute résolution, au-delà de la limite de diffraction, peut ainsi être reconstruite [232].

La STORM, la PALM et la FPALM ont pour principe « d'imager » une molécule unique. Pour cela, le laser illumine de façon intermittente des fluorochromes spécifiques photo-activables capables d'être désactivés lorsqu'ils ne sont pas illuminés, afin de différencier la fluorescence émise spécifiquement après excitation par le laser de celle émise en continu [232,236]. La PALM et la STORM ont été utilisées pour étudier les étapes d'assemblage du virus et son interaction avec des protéines cellulaires à ce stade de l'infection (Figure 23) [65,236,243].



**Figure 23:** Visualisation des sites de bourgeonnement de particules virales HIV sur des LT par STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy).

Adapté de Eckhardt et al. [243].

*Les particules virales modifiées contiennent un motif SNAP et sont visualisées en rouge (cf. Outils virologiques : Marquages indirects). B : Zoom des encadrés de la figure A. Echelle : 200nm.*

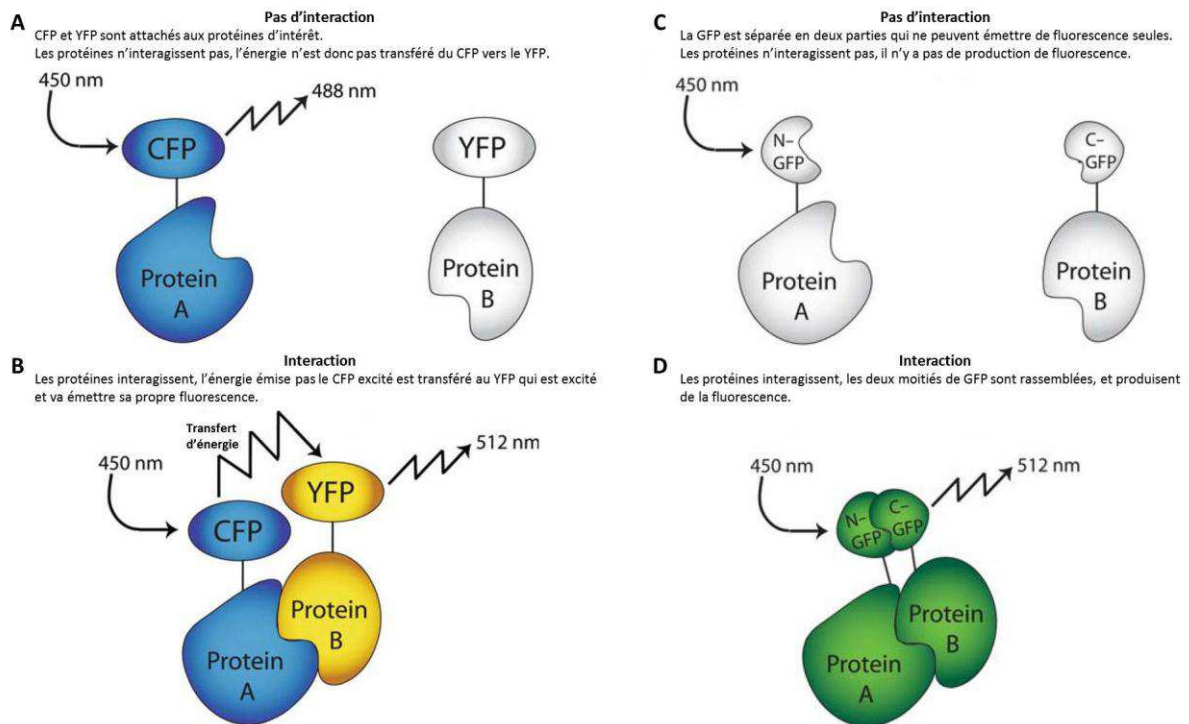
Une visualisation en 3 dimensions des échantillons étudiés est possible en utilisant ces techniques, excepté la SSIM pour laquelle la reconstitution en 3 dimensions n'a pas encore été démontrée mais qui est possible en théorie [232]. En revanche, les techniques de visualisation de la fluorescence à haute résolution permettent difficilement de réaliser des acquisitions en temps réel,

cela étant dû à des difficultés techniques concernant notamment les marquages de cellules vivantes et la faible rapidité d'acquisition d'images [232]. Pourtant, des imageries en temps réel, de HIV notamment, ont pu être réalisées en utilisant des techniques de visualisation de la fluorescence à haute résolution, et des études sont en cours afin de développer ces techniques [65,231,232].

Les techniques de visualisation à haute résolution présentent une limite dans l'éventail des fluorochromes utilisables, étant donné qu'elles utilisent des fluorochromes photochimique ou photophysiques peu développés. Des recherches sont en cours afin de développer un maximum de fluorochromes communs avec ceux des techniques de microscopie à épi-fluorescence et confocale [231,232,236,244]. De plus, les techniques de visualisation à haute résolution requièrent un équipement hautement spécialisé qui n'est pas forcément simple à mettre en place au sein de la plupart des laboratoires [236].

D'autres techniques de microscopie à fluorescence ont été développées (e.g. FRET : Förster Resonance Energy Transfer [245], BiFC : Bimolecular Fluorescence Complementation, alternative au FRET (Figure 24) ; FFS : Fluorescence Fluctuation Spectroscopy ; FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching) [65,235,236]. La microscopie par FRET permet une résolution de 2 à 10 nm. Elle est principalement utilisée pour visualiser la co-localisation entre deux protéines, notamment en imagerie en temps réel dans des cellules vivantes [65,236]. En effet, avec le FRET, la proximité entre deux protéines d'intérêt permet l'émission d'un signal fluorescent. Pour cela, les 2 protéines d'intérêt sont conjuguées à une paire spécifique de fluorochromes (le plus souvent Cyan Fluorescent Protein, CFP, et Yellow Fluorescent Protein, YFP). CFP et YFP ont des profils de fluorescence qui se chevauchent légèrement. Après excitation du CFP par une longueur d'onde de 450 nm, ce fluorochrome émet de la fluorescence précisément à la longueur d'onde d'excitation de l'YFP (488 nm). Ainsi, si ces deux fluorochromes se trouvent à proximité, grâce à l'interaction des protéines d'intérêt, l'excitation du CFP va induire l'émission du YFP (512 nm) (Figure 24 A-B) [236]. Le FRET est très utilisé pour étudier l'interaction des particules virales HIV avec les cellules hôtes. Pourtant cette technique ne permet pas de mettre en évidence une interaction directe. En effet, une grande proximité entre les protéines d'intérêt permet l'émission d'un signal fluorescent, même si les protéines n'interagissent pas directement. La BiFC permet en partie d'éliminer le risque d'émission de fluorescence sans interaction directe entre les deux protéines d'intérêt. Elle est basée sur le principe de complémentarité entre deux protéines. Chaque protéine d'intérêt est conjuguée à une moitié de fluorochrome. Lorsque les protéines vont interagir, le fluorochrome sera complété et pourra émettre sa fluorescence (Figure 24 C-D).





**Figure 24: Principe des techniques FRET (Förster Resonance Energy Transfer) et BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation).**

D'après Danielson et al. [236]

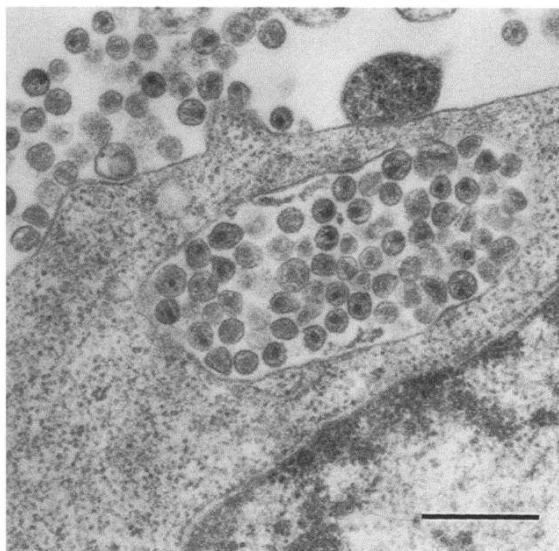
**(A-B) : FRET.** A : Pas d'interaction, CFP et YFP sont attachés à leur protéine d'intérêt. Les protéines n'interagissent pas, il n'y a donc pas de transfert d'énergie au YFP. B : Les protéines interagissent, l'énergie émise par la CFP est transférée à l'YFP et l'excite. **(C-D) : BiFC.** C : Pas d'interaction, la GFP est séparée en deux, la fluorescence ne peut donc pas être émise. D : Les protéines interagissent, les deux parties de la GFP sont rassemblées et produisent de la fluorescence.

Les techniques de visualisation de la fluorescence à haute résolution dans le cadre de la virologie sont encore peu répandues. Le développement des fluorochromes et des microscopes devrait permettre d'augmenter leur utilisation [236].

Enfin, la microscopie électronique à transmission est une technique répandue en virologie, car elle permet de visualiser le virus et sa structure au sein de l'échantillon étudié grâce à une résolution pouvant atteindre 0,08 nm (Figure 25) [60,65,246]. C'est grâce à cette technique que HIV a été visualisé pour la première fois en 1983 (Figure 1) [2]. La microscopie électronique a notamment permis d'élucider la structure morphologique et protéique de HIV, d'étudier son cycle de réplication ainsi que la structure adoptée par le virus au cours de la maturation [27,32,60,246]. Cette technique est très coûteuse et n'est pas utilisable pour des études en temps réel ou pour une visualisation en 3



dimensions dans une muqueuse, puisqu'elle permet seulement d'étudier des échantillons en coupe fixés [60,246]. Elle est donc difficilement utilisable dans le cadre d'études sur la transmission hétérosexuelle à travers la muqueuse génitale féminine.



**Figure 25:** Section fine de particules HIV dans une vacuole cytoplasmique et dans le milieu extracellulaire de cellules infectées vues en microscopie électronique à transmission.

D'après Goto et al. [246]

Pour l'heure, la microscopie confocale alliant une utilisation facile, une forte résolution, une réduction importante du bruit de fond, l'utilisation de nombreux fluorochromes, et la possibilité d'une imagerie en temps réel constitue un excellent compromis dans la plupart des études [65,232].

### ***B. Outils virologiques***

Au cours des années différents, outils virologiques ont été développés afin d'étudier et de visualiser le cycle de réplication de HIV, mais aussi son interaction avec les protéines de la cellule cible, ou encore sa transmission de cellule à cellule et son passage à travers la muqueuse lors d'une transmission sexuelle [236]. Historiquement, les premières visualisations du virus ont été réalisées grâce à des marquages indirects de protéines virales (le plus souvent Gag ou p24) par un anticorps couplé à un fluorochrome [220], ou à d'autres stratégies telles que l'insertion de motifs SNAP ou tétra cystéine [243,247]. Ces outils ne permettant pas de répondre à certaines questions concernant

le virus, des pseudovirus exprimant directement un fluorochrome (la GFP et ses dérivés dans un premier temps), capables d'infecter des cellules et de procéder à un seul cycle de réplication ont été construits [61]. Par la suite, avec l'évolution de l'imagerie en temps réel, il a été nécessaire de construire des virus chimériques capables de se répliquer sur plusieurs cycles et exprimant également un fluorochrome [233]. Certaines études utilisant ces outils virologiques sont décrites dans les chapitres suivants, et sont résumées dans le tableau 3.

## 1. Marquages indirects

La plupart des études portant sur la transmission hétérosexuelle ont utilisé des techniques de marquage indirect du virus HIV par des anticorps couplés à un fluorochrome, après fixation des cellules infectées et perméabilisation. Ainsi, Howell et coll. ont utilisé un marquage anticorps anti-Nef afin de détecter la présence du virus dans la muqueuse du tractus génital féminin supérieur et inférieur [220]. De même, Fox-Canale et coll. ont utilisé cette technique afin de détecter la coinfection de cellules cervicales par CMV et HIV. La détection de la présence de HIV dans ces cellules a été faite par marquage de p17/p24 par un anticorps couplé à un fluorochrome, ce qui a permis de visualiser le virus dans le modèle *ex vivo* de muqueuse cervicale [215].

Le marquage indirect par un anticorps couplé à un fluorochrome a l'avantage d'être peu cher et permet de localiser le virus dans une cellule. En revanche, la sensibilité du marquage est insuffisante et les sites de liaison aux anticorps sur les protéines virales peuvent ne pas être exposés, ce qui empêche la fixation des anticorps aux sites d'intérêt et leur détection [245]. De plus, la détection en temps réel n'est pas possible puisque le marquage anticorps implique le plus souvent la fixation et la perméabilisation des cellules infectées, rendant difficile l'étude des étapes du cycle de réplication du virus. Ainsi, cette technique ne permet pas d'étudier les interactions dynamiques du virus avec la cellule ou encore de suivre en temps réel l'évolution du virus dans des cellules vivantes.

Des techniques de détection indirecte du virus n'utilisant pas d'anticorps ont également été développées (e.g. marquage FIAsh). Le principe du marquage FIAsh est de produire un pseudovirus dans lequel est intégré un motif tétra-cystéine ; celui-ci sera ensuite ciblé par le réactif de marquage FIAsh (bi-arsenic) qui ne fluoresce qu'après sa reconnaissance [65,232,247,248]. Cette technique permet de visualiser les étapes tardives de réplication de HIV après transfection du pseudovirus et marquage, ainsi que les étapes précoces de réplication du virus après infection de cellules permissives par le pseudovirus et marquage. En revanche, cette technique de visualisation peut détecter un marquage intracellulaire non spécifique, comme cela a été montré par différents auteurs [235,243,249,250]. Arhel et coll. l'ont utilisée pour visualiser le virus dans des cellules vivantes. Cette équipe a pu éviter en partie la détection de fluorescence non spécifique en marquant les virions *in*

*vitro* et en les purifiant par ultracentrifugation. Elle a pu ainsi visualiser la trajectoire des particules virales en temps réel dans des cellules vivantes [247].

L'équipe de Eckhardt utilise quant à elle une technique de codage génétique, le SNAP-tag, basée sur le même principe que celui décrit ci-après pour les protéines de fusion (cf. Outils virologiques – Pseudovirus « one-shot »), si ce n'est le poids moléculaire plus bas du marqueur [243]. La protéine résultante n'est pas fluorescente mais elle peut être couplée à n'importe quel substrat spécifique du SNAP-tag comme l'O<sup>6</sup>-benzylguanine (BG). Une grande variété de fluorochromes synthétiques couplés au BG sont disponibles et montrent une forte stabilité dans le temps et à l'excitation [65,243].

Un risque de réactivité non spécifique reste présent, même si ces techniques sont plus fiables que celles basées sur le marquage anticorps de protéines virales. De plus, elles ne permettent pas d'étudier les mécanismes impliqués dans la sélection R5 lors d'une transmission sexuelle, dans le contexte d'une double infection par des virus à tropisme X4 et R5. En effet, elles obligent à infecter les muqueuses soit par le virus X4 soit par le virus R5, mais pas par les deux en même temps, ni de visualiser séparément le virus associé aux cellules et le virus libre.

## 2. Pseudovirus « one-shot »

L'utilisation de protéines fluorescentes fusionnées génétiquement à une protéine d'intérêt est une alternative aux limites observées avec les anticorps fluorescents et autres marquages indirects, d'autant que ces protéines de fusion sont plus petites que les anticorps et donc utilisables en imagerie en temps réel. Pour l'étude de HIV, ces protéines de fusion fluorescentes sont souvent incorporées dans des particules virales afin de créer des pseudovirus [236]. Les pseudovirus « one-shot » sont obtenus par co-transfection d'un plasmide codant le génome HIV avec un plasmide codant une protéine virale fusionnée à un fluorochrome, ce qui aboutit à la production de particules virales fluorescentes sur un seul cycle de réplication [231]. L'utilisation de ce type de virus implique de valider sa fidélité morphologique ainsi que sa capacité de réplication comparé à un virus sauvage, non modifié [241]. L'utilisation combinée de pseudovirus exprimant une protéine virale fusionnée à un fluorochrome et de techniques de visualisation performantes ont permis d'élargir les possibilités de recherches sur HIV, notamment quant à son fonctionnement et son comportement dans diverses conditions [61,65,231,241]. Les premiers pseudovirus HIV construits comportaient une protéine de fusion Gag-GFP et ont permis de comprendre de nombreux mécanismes impliqués dans la transmission HIV, notamment la transmission cellule-cellule grâce à l'imagerie en temps réel [61,241,251]. En effet, la détection directe du pseudovirus permet de le visualiser, en évitant les risques de fluorescence non spécifique, et de suivre son évolution en temps réel dans une population

cellulaire. Les pseudovirus « one-shot » exprimant des protéines de fusion montrent néanmoins certaines limites, notamment pour leur utilisation dans des études d'imagerie en temps réel dans des cellules vivantes sur plusieurs jours, du fait de leur faible capacité à exprimer de la fluorescence après un long temps d'excitation et du risque de voir diminuer la fonctionnalité du pseudovirus si la protéine de fusion est un multimère [61,65,231].

L'utilisation de pseudovirus « one-shot », qui n'expriment leur fluorescence que sur un cycle de réplication, ne permet pas d'étudier la transmission dans le temps, et donc de visualiser la transmission de HIV à travers la muqueuse génitale féminine. L'équipe de Shen a cependant étudié la capture de particules virales HIV par les macrophages présents dans les muqueuses vaginales et intestinales *ex vivo*. Pour cela ils ont construit un pseudovirus « one-shot » associé à GFP. Après mise en contact du virus avec les muqueuses et marquage des particules virales avec un anticorps anti-GFP, la visualisation de la présence de virus dans les macrophages muqueux a été réalisée par microscopie confocale [251]. Cette étude a permis de montrer que les macrophages de la muqueuse vaginale pouvaient être infectés par HIV. Cependant, le pseudovirus utilisé n'étant pas réplicatif, il ne permet pas de déterminer le rôle exact des macrophages dans la transmission hétérosexuelle. De plus, le fait de marquer les particules virales fluorescentes par un anticorps dirigé contre le fluorochrome augmente le risque de détection de fluorescence non spécifique [251]. L'équipe de Hope a également produit un pseudovirus réplicatif ayant incorporé une protéine de fusion Vpr-GFP sur un cycle de réplication [61]. Ce pseudovirus a permis d'étudier par imagerie en temps réel et microscopie confocale les étapes précoces du cycle de réplication du virus post-entrée, et notamment le déplacement des virions du cytoplasme vers le noyau [61], ainsi que les étapes de transcription inverse et la localisation du virus dans la muqueuse orale [252]. Ce pseudovirus est porteur d'une enveloppe VSV-g (Vesicular Stomatitis Virus) qui a un tropisme ubiquitaire, ce qui permet l'entrée d'un maximum de virus dans les cellules [61,235]. Afin de différencier les virions entrant par fusion et initiant une infection productive, de ceux entrant par endocytose, Campbell et coll. ont construit un pseudovirus doublement marqué comportant une protéine de fusion GFP-Vpr et une protéine de fusion S15-mCherry [235,253]. La protéine S15 est une protéine présente au niveau de la membrane cellulaire. Elle est incorporée dans l'enveloppe du virion lors du bourgeonnement, et dans la membrane de la cellule cible, avec l'enveloppe virale, au moment de la fusion des membranes [253]. Ce pseudovirus est donc un outil très utile afin de déterminer le mode d'entrée du virus, notamment dans les muqueuses. Ce pseudovirus ne permet cependant de visualiser que les étapes précoces du cycle de réplication suite à une perte de la fluorescence du GFP-Vpr 4h post-infection, au moment de l'import nucléaire du PIC [236,253]. Ce type de virus recombinant a l'avantage d'être réplicatif, cependant la protéine de fusion incorporée n'étant visible

que pendant un cycle de réplication, son intérêt est limité pour les études de transmission à travers une muqueuse s'étalant sur plusieurs jours.

### 3. Virus chimériques

L'utilisation de virus chimériques, réplcatifs et infectieux, porteurs d'un fluorochrome sur plusieurs cycles de réplication semble mieux adaptée à l'étude des mécanismes impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV. Ces virus recombinants sont obtenus par ligation d'un plasmide codant la protéine virale fusionnée à un fluorochrome, à un plasmide codant le génome HIV délété de la protéine virale utilisée pour la fusion ; le vecteur obtenu est transfecté dans des cellules afin de produire le virus recombinant. Il est difficile d'obtenir les plasmides codant des virus chimériques, étant donné qu'il est nécessaire de construire un vecteur codant à la fois le génome HIV et la protéine de fusion placée de façon à ne pas gêner la formation du virus [233,245]. La construction de virus chimériques nécessite de vérifier la morphologie et la capacité de réplication du virus, ainsi que la fonctionnalité et la structure des protéines virales [233].

Müller et coll. ont construit un virus chimérique porteur d'un fluorochrome GFP fusionné à la protéine Gag, entre les domaines MA et CA. Ce virus chimérique est capable de se répliquer dans des cellules permissives, avec la même efficacité que des virus sauvages, tout en gardant l'expression de la protéine de fusion. Les particules virales exprimant majoritairement la protéine de fusion Gag-GFP sont moins infectieuses que les virus sauvages ; ce qui a conduit les auteurs à modifier le taux d'expression de la protéine de fusion Gag-GFP dans les virions chimériques, pour construire des virions chimériques mixtes, exprimant à la fois la protéine Gag sauvage et la protéine de fusion Gag-GFP [233]. Ces virus présentent la même infectivité que les virus sauvages ; en revanche, au cours des cycles de réplication le phénotype modifié est perdu, puisque seuls des virus exprimant la protéine Gag sauvage sont retrouvés après plusieurs passages, ce qui limite leur utilisation [233]. De plus, ces virus chimériques ne sont réplcatifs sur plusieurs cycles que dans la lignée de LT MT4, mais pas dans une autre lignée cellulaire de LT, les cellules Jurkat, ni dans LT primaires (PBMC) [233,241,245]. Ce virus chimérique a permis de visualiser par microscopie confocale en temps réel, et par FRET, la localisation et la dynamique de la protéine Gag dans la cellule cible au cours des étapes tardives de réplication de HIV, et de renseigner sur l'efficacité et la dynamique de la transmission cellule-cellule du virus [238,241,245]. L'équipe de Kirchhoff a également construit un virus chimérique exprimant directement le fluorochrome eGFP (enhanced-GFP) en clonant le gène codant cette protéine fluorescente juste après le gène *nef* [54]. Cette équipe a produit divers variants porteurs de Nef provenant de différentes souches de HIV et SIV afin d'étudier le rôle de cette protéine dans l'infectivité. Ce virus chimérique est aussi infectieux que le virus sauvage sur plusieurs lignées cellulaires reportrices (TZM-bl et HeLaP4), et s'avère réplcatif sur plusieurs cycles, même si

une perte de la séquence IRES-eGFP, et donc de sa fluorescence, est observée après plusieurs cycles [54].

Peu de virus chimériques infectieux et réplicatifs porteurs d'un fluorochrome sur plusieurs cycles ont été construits à l'heure d'aujourd'hui. Pourtant leur utilisation tend à augmenter, étant donné les avantages non négligeables que les virus recombinants apportent. En effet, ils permettent de suivre en temps réel, sur plusieurs cycles, une protéine virale ou un virus dans divers environnements cellulaires [54,233,238,245]. Ce type de construction virale constitue donc un outil essentiel pour l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme et la sélection R5 observée dans ce mode de transmission. Il permet d'étudier cette transmission tant dans un contexte de virus libre que de virus associé aux cellules, et de simuler la transmission hétérosexuelle dans des conditions se rapprochant des situations physiopathologiques observées *in vitro* et *ex vivo*.

But de l'étude	Méthode utilisée	Avantages	Limites	Référence
Infection des muqueuses génitales féminines	Infection d'explants d'endocol, exocol, vagin, trompes de Fallope. Marquage anticorps anti-Nef couplé FITC. Visualisation par microscopie à épi-fluorescence et confocale	Utilisation de virus sauvages, non modifiés ; large éventail de fluorochromes disponibles	Cellules fixées et souvent perméabilisées, risque de fort bruit de fond et de faux positifs	Howell et al. 1997 [220]
Coinfection HIV-CMV	Infection d'explants de muqueuse cervicale. Marquage anticorps anti-p17/p24 couplé. Visualisation par microscopie à épi-fluorescence	Virus sauvages, non modifiés ; large éventail de fluorochromes disponibles ; simple d'utilisation	Risque de fort bruit de fond et faux positifs ; détection de la localisation cellulaire de faible résolution	Fox-Canale et al. 2007 [215]
Transcytose de HIV à travers l'endocol	Infection d'une lignée endocervicale (HEC-1). Marquage anticorps anti-p24 couplé. Visualisation par microscopie confocale	Détection de virus dans le cytoplasme (profondeur de la cellule)	Risque de marquage non spécifique (anticorps). Pas de différenciation entre virus X4 ou R5	Carreno et al. 2002 [221]
Interactions virus-hôte	Infection de LT (lignées cellulaires) par un virus SNAP-Tag (entre Gag et CA). Visualisation par microscopie confocale, TIRF et dSTORM	Insertion de faible poids moléculaire ; Large éventail de fluorochromes disponibles ; Virus répliquatif	Risque de faux positifs (utilisation d'un réactif secondaire)	Eckhardt et al. 2011 [243]
Interactions virus-hôte	Utilisation d'un virus pseudotypé (env VSV-G) + insertion d'un résidu tétra cystéine, marquage bi-arsenic. Visualisation par microscopie confocale et confocale en temps réel	Visualisation 3D et 4D dans le cytoplasme et noyau cellulaire ; insertion de petite taille dans le génome viral	Risque de faux positifs (utilisation d'un réactif secondaire)	Arhel et al. 2006 [247]
Transmission hétérosexuelle et sélection R5	Hybridation <i>in situ</i> (ARNm) fluorescence ultrasensible, sur un modèle <i>ex vivo</i> de muqueuse cervicale infectée. Visualisation par microscopie confocale	Détection d'ARNm et non de protéines virales	Risque de faux positifs (visualisation indirecte) ; Pas de doubles infections (X4 et R5) possible	Gupta et al. 2002 [218]
Mécanisme d'entrée dans la cellule	Construction d'un virus pseudotypé (env VSV-G) doublement marqué GFP-Vpr et S15-mCherry.	Possibilité de différencier l'entrée de HIV par fusion ou par endocytose et virus à tropisme X4 et R5 (fluorochromes différents)	Perte rapide de la fluorescence membranaire si fusion et GFP-Vpr (4h post infection).	Campbell et al. 2007. [253]
Infection des macrophages dans les muqueuses	Infection d'explants de muqueuses vaginales et intestinales par un pseudovirus Gag-GFP + marquage anticorps anti-GFP, visualisé par microscopie confocale	Possibilité de différencier virus à tropisme X4 ou R5 dans une double infection.	Risque de faux positifs et de bruit de fond indissociable de la fluorescence du virus (anticorps) ; suivi en temps réel impossible ; 1 seul cycle de réplication	Shen et al. 2009 [251]
Construction d'un virus chimérique ; Localisation de Gag dans la cellule	Construction d'un virus chimérique Gag-GFP (entre MA et CA) + Virus mixte : exprime 50% Gag-GFP + 50% Gag. Tests d'infection sur HeLaP4, TZM-bl MT4 (LT). Visualisation par MET + FRET + épi fluorescence + Confocale + temps réel	Virus chimérique : Virus fluorescent et répliquatif sur plusieurs cycles. Virus mixte : Même infectivité que le virus sauvage	Construction difficile, répliquatif seulement en LT (lignée MT4). Virus chimérique moins infectieux que le virus sauvage. Virus mixte : utilisable sur 1 cycle de réplication	Müller et al. 2004 [233] Hübner et al. 2007 et 2009 [238,245]
Rôle de Nef dans l'infectivité	Construction d'un virus chimérique fluorescent dans Nef (eGFP). Test d'infection sur HeLaP4, TZM-bl, PBMC	Virus répliquatif fluorescent dans une protéine accessoire => structure et infectivité intactes, suivi sur plusieurs cycles	Construction délicate, perte de la séquence IRES-eGFP après plusieurs cycles de réplication	Münch et al. 2007 [54]

**Tableau 3: Synthèse non exhaustive des avantages et limites des différents marquages et des techniques de visualisation utilisées dans les études sur HIV.**

*MET : Microscopie électronique à transmission. FITC: Fluorescein IsoThioCyanate.*

## II. Modèles d'études biologiques

L'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV est étudiée sur différents types de modèles cellulaires, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, possédant chacun leurs avantages et leurs inconvénients (Tableau 4).

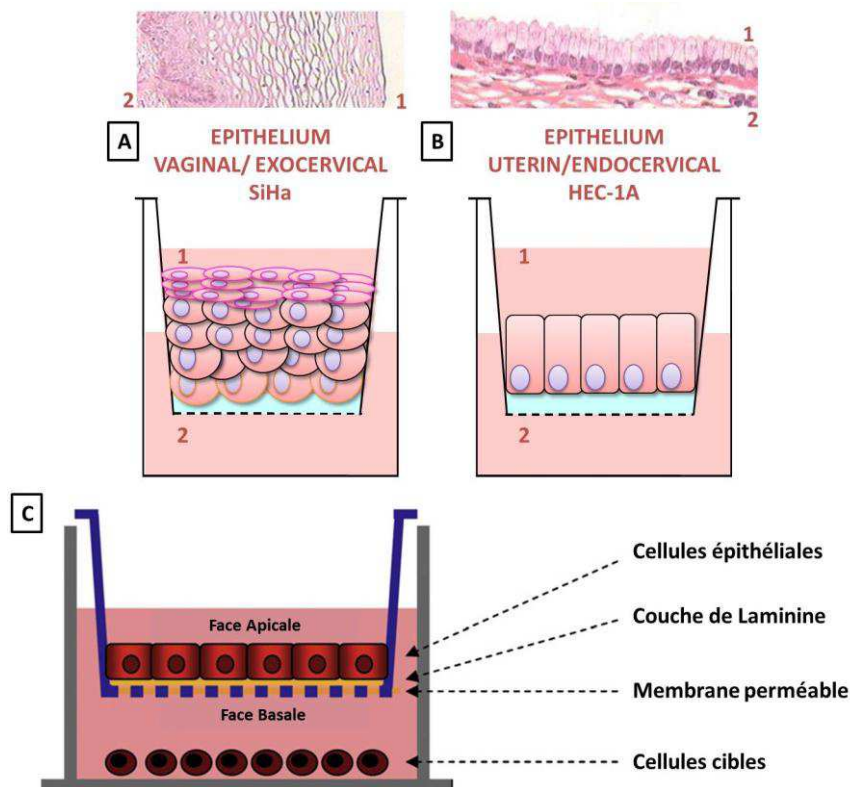
### A. Modèles *in vitro*

Divers modèles cellulaires *in vitro* ont été développés et utilisés afin d'étudier la transmission de HIV de l'homme vers la femme. Ces modèles *in vitro* utilisent majoritairement des cellules épithéliales génitales immortalisées qui ont l'avantage d'être reproductibles et facilement utilisables. En revanche ces modèles ne sont pas représentatifs de la structure architecturale de la muqueuse et de l'environnement cellulaire (cellules de l'immunité) dans laquelle se trouve la muqueuse génitale *in vivo* [97,199,254]. Différentes lignées cellulaires sont utilisées pour mettre en place les modèles de muqueuse en fonction de la zone génitale féminine étudiée [185]: cellules HEC-1A ou End1 pour l'endocol [97,153], cellules SiHa ou Vk2 pour la muqueuse vaginale [199,209], cellules Ect1 pour la muqueuse de l'exocol [209] et cellules ME-180 pour le col de l'utérus [187]. Les lignées cellulaires présentent l'avantage d'être facilement cultivables, en grande quantité et dans le temps. Elles présentent également de nombreuses caractéristiques similaires aux cellules *ex vivo*, notamment en termes d'expression de récepteurs membranaires et de différenciation cellulaire [198]. D'autres modèles muqueux *in vitro* sont constitués à partir de cellules primaires, qui ne sont pas des lignées cancéreuses, et présentent donc des caractéristiques plus physiologiques que les lignées cellulaires, mais plus difficiles à préparer et cultiver [185]. Ainsi, un des modèles utilisé par Michelini et coll. est un modèle de kératinocytes primaires du col utérin (exocol) cultivés dans des conditions appropriées, qui miment l'environnement stromal naturel [192]. Bobardt et coll. ont utilisé des cellules primaires provenant d'une muqueuse vaginale, qu'ils ont isolées et mises en culture sur filtres afin de reconstituer une muqueuse simplifiée avant de l'infecter par HIV.

Ces modèles de muqueuse reconstruite sont cultivés sur des filtres permettant de mimer la polarisation des cellules dans la muqueuse génitale féminine, avec une face apicale (lumière) et une face basale (sous-muqueuse) (Figure 26) [96,97,185,196,198]. Le virus est déposé au niveau de la face apicale du modèle (Figure 26-1). L'étude de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme utilisant ce type de modèle se fait par différentes stratégies en fonction du but de l'étude : détection de particules virales au niveau du milieu basal [96] ; mise en contact avec des cellules permissives ou reportrices au niveau basal et étude de l'infection de ces cellules [96,196] ; étude de



l'épithélium muqueux [96,153] ; étude du passage de cellules immunitaires à travers la muqueuse [198,221].



**Figure 26: Représentations schématiques de modèles de muqueuse reconstruite sur filtre et de coupes histologiques des muqueuses.**

Adapté de Berlier et al. [199] (A-B) et Gali et al. [254] (C)

*Les cellules épithéliales génitales féminines sont déposées au niveau apical (1) de façon à ce qu'elles reconstituent une muqueuse se rapprochant d'une muqueuse normale. A : Muqueuse vaginale reconstruite. B : Muqueuse endocervicale reconstruite. 1 : Face apicale. 2 : Face basale. C : Dans certains modèles, des cellules cibles peuvent être déposées au niveau basal et une couche de Laminine peut être déposée sur la membrane du filtre avant culture des cellules épithéliales.*

Ainsi, afin d'évaluer la capacité de HIV à traverser la muqueuse endocervicale par transcytose, l'équipe de Bomsel a mis au point une muqueuse endocervicale reconstruite à partir de cellules HEC-1, lignée cellulaire la plus utilisée pour reconstruire ce type de muqueuse. Après infection, les auteurs ont mis en contact le virus ayant traversé la muqueuse, donc présent dans le

milieu basal, avec des cellules reportrices permettant d'évaluer le pouvoir infectieux du virus après traversée de la muqueuse endocervicale [196]. A partir de leur modèle de muqueuse reconstruite utilisant des cellules primaires, Bobardt et coll. ont utilisé plusieurs de ces stratégies afin d'évaluer la capacité du virus à traverser la muqueuse génitales féminine. Ils ont dosé dans le milieu basal la quantité de particules virales ayant traversé la muqueuse reconstruite après infection au niveau apical. Ils ont également étudié la présence de particules virales au sein de la muqueuse. Pour cela, ils ont vérifié la présence des récepteurs alternatifs et corécepteurs de HIV sur ces cellules, puis évalué la quantité de particules virales attachées et ayant pénétré dans les cellules épithéliales génitales féminines après infection. Combinant ces différentes approches ils ont précisé certains mécanismes impliqués dans la transcytose [96].

Ces modèles *in vitro* de muqueuses génitales féminines reconstruites sont également utilisés afin d'étudier l'implication des cellules immunitaires de l'hôte, ou de virus associés aux cellules issues du sperme, dans la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme. Ainsi, afin d'évaluer le passage des LC à travers la muqueuse vaginale féminine dans diverses conditions inflammatoires, une lignée de cellules SiHa a été utilisée au sein du laboratoire pour reconstruire une muqueuse vaginale [198]. Après dépôt de LC marquées au CFSE (marqueur cellulaire fluorescent) sur la face apicale de la muqueuse reconstruite, le passage des LC à travers la muqueuse a été évalué par cytométrie en flux et microscopie confocale. Cremel et coll. ont ainsi pu déterminer que les LC sont recrutées au niveau du contact virus-cellule épithéliales dans des conditions pro-inflammatoires, qui peuvent être induites par le virus [198].

Par ailleurs, l'équipe de Bélec a utilisé un modèle de muqueuse reconstruite à partir de la lignée de cellules endocervicales HEC-1, afin d'évaluer la capacité de transmigration de MDM infectés par HIV, à travers la muqueuse endocervicale en conditions pro-inflammatoires. Pour cela, la quantité de MDM ayant traversé la muqueuse endocervicale reconstruite du pôle apical vers le pôle basal a été mesurée dans le milieu basal. Les auteurs ont ainsi démontré que l'environnement pro-inflammatoire au niveau du site d'infection est indispensable pour une transmigration active des MDM infectés par HIV à travers la muqueuse endocervicale [221].

Ces modèles *in vitro* sont très utilisés pour étudier les étapes initiales de la transmission sexuelle de HIV puisqu'ils sont peu chers, reproductibles et faciles à mettre en place, à moduler et à complexifier (Tableau 4). En revanche, ces modèles sont trop simples pour rendre compte de l'ensemble des facteurs mis en jeu *in vivo*, puisqu'ils ne contiennent, pour la majorité, que les cellules épithéliales de la muqueuse et pas, ou peu, de cellules immunitaires. C'est pourquoi il a été

développé des modèles *ex vivo* plus aptes à mimer la situation physiopathologique observée *in vivo* (Tableau 4).

## **B. Modèles *ex vivo***

Ces modèles présentent des caractéristiques plus physiologiques que les modèles *in vitro*, mais sont plus simples d'obtention et d'utilisation que les modèles *in vivo* (Tableau 4) [184].

Les modèles de muqueuse génitale féminine *ex vivo* sont obtenus à partir d'explants de muqueuse génitale féminine. Ces explants sont pour la plupart cultivés *ex vivo* en milieu contenant des antibiotiques et antifongiques, ce qui peut poser des problèmes pour les agents microbiens constituant de la muqueuse. De plus, la culture des tissus est difficile puisqu'on observe une perte de l'étanchéité et de l'intégrité de la muqueuse si celle-ci est cultivée trop longtemps. En effet, on observe une perte des couches supérieures de la muqueuse dans le cas d'une muqueuse de l'exocol [16,192]. En revanche, les muqueuses de l'endocol sont bien conservées pendant 7 jours, probablement du fait de la forte production de mucus par les cellules de l'épithélium endocervical [16,194].

Plusieurs équipes ont ainsi utilisé des cultures organo-typiques, représentatives de la structure architecturale de la muqueuse *in vivo* [184,192,194,218,224]. Pour cela, des morceaux d'explants d'exocol ont été mis en culture afin de respecter l'architecture, l'environnement cellulaire et cytokinique local présent *in vivo* (Tableau 4). Grâce à ces modèles, Micheline et coll. ont analysé les facteurs et les mécanismes impliqués dans la différenciation et la migration des leucocytes dans les compartiments intra-épithéliaux [192]. Ils ont également étudié la transmission du virus à travers la muqueuse, évalué le taux de passage de virus seul et de celui du virus associé aux cellules, et apprécié l'importance du tropisme viral dans la transmission [224]. Ainsi, ils ont déterminé que le virus libre établit plus rapidement une infection que le virus associé aux cellules [192,218,224]. Gupta et coll. ont également montré grâce à ces modèles de culture de muqueuse exocervicale *ex vivo*, que les premières cellules infectées par HIV-1 sont les LT CD4 mémoires muqueux [184,218].

Ces modèles muqueux *ex vivo* sont intéressants et utiles pour l'étude de la transmission HIV en revanche, leur maintien en culture étant possible seulement entre 7 et 9 jours, cela limite l'étude d'autres mécanismes d'infection par HIV, comme celle des réservoirs ou encore celle des coinfections virales à long terme [215]. Afin d'étudier la coinfection de HIV avec CMV, qui nécessite une culture de 21 jours sur cellules vivantes, Fox-Canale et coll. ont développé un modèle de culture *ex vivo* de la muqueuse cervicale. Ce modèle a été mis en place à partir d'explants de femmes ménopausées, cultivables dans un milieu spécifique pendant 28 jours. Grâce à ce modèle, les auteurs ont montré

dans un environnement physiopathologique que la muqueuse cervicale est sensible à l'infection par CMV sous forme libre et associée aux cellules, ainsi qu'à la coinfection avec HIV à tropisme R5. De plus, ils ont montré que l'infection par HIV augmente la réplication de CMV dans les muqueuses, probablement en altérant la production de cytokines [215].

Afin de visualiser directement la pénétration du virus dans la couche épithéliale vaginale et ses interactions avec les différentes cellules qui la composent, Hladik et coll. ont développé un système de culture d'organe humain *ex vivo* qui permet la séparation de la couche épithéliale squameuse vaginale et le stroma vaginal sous-jacent. Ils ont ainsi pu étudier l'infection directe des cellules immunitaires intraépithéliales par HIV [113]. Pour cela, ils ont utilisé des pseudovirus contenant une protéine de fusion Vpr-GFP visualisée par microscopie confocale, et des marquages *in situ* des cellules immunitaires composant la muqueuse vaginale. Ils ont ainsi observé que, lorsque ce modèle muqueux est mis en contact avec HIV, le virus pénètre rapidement dans les LC et LT CD4 de la muqueuse vaginale [113]. Ce système de culture *ex vivo* présente de nombreux avantages pour étudier l'infection de l'épithélium vaginal par HIV. Premièrement, le virus peut pénétrer les feuillets épithéliaux par leur pôle apical ou basal, ce qui permet l'observation des interactions virus-cellule. De plus, les feuillets peuvent être analysés par microscopie confocale standard dans leur profondeur totale, ce qui permet une visualisation *in situ* de l'infection des cellules intra-épithéliales par le virus. Enfin, la séparation de l'épithélium squameux et du stroma vaginal permet de distinguer les cellules migrantes d'origine intra-épithéliales ou stromales [113]. Ce modèle d'étude *ex vivo* de la muqueuse vaginale est utile pour la détermination de mécanismes précis mis en jeu entre le virus et les cellules de certaines couches de la muqueuse vaginale. Il ne permet cependant pas une étude globale de la transmission hétérosexuelle de HIV à travers la muqueuse vaginale [113].

La culture *ex vivo* d'explants d'endocol, permettant de respecter la structure architecturale et l'environnement cellulaire et microbien de la muqueuse *in vivo*, a été réalisée par Michelini et coll. en 2005 [194]. Les morceaux d'explants d'endocol mis en culture permettent d'étudier des modifications physiologiques de la muqueuse, de tester l'effet de différents facteurs environnementaux et agents infectieux sur la structure et la fonction des cellules endocervicales (Tableau 4). Les auteurs ont construit un modèle de culture organo-typique de muqueuse endocervicale, selon la même méthode que celles qu'ils ont utilisé en 2004 sur un modèle de muqueuse exocervicale, qui présente des caractéristiques structurales et physiologiques similaires à celles observées *in vivo*, pendant 10 jours de culture. Ce modèle *ex vivo* de muqueuse endocervicale est un bon outil pour l'étude des modifications structurales de la muqueuse et pour l'étude de la transmission de HIV à travers cette muqueuse [194].

De nombreuses études ont été effectuées sur des modèles *ex vivo*, pour élucider la transmission hétérosexuelle de HIV (Tableau 4), cependant, ces modèles ont une limite majeure, qui est l'hétérogénéité inter-explant, ce qui rend difficile l'interprétation de résultats obtenus lors de telles études [184,185].

### C. Modèles *in vivo*

L'utilisation de modèles *in vitro* et *ex vivo* est courante, principalement du fait de leur facilité d'utilisation et d'obtention, de leur reproductibilité (modèles *in vitro*) et de leur faible coût (Tableau 4). Cependant les observations effectuées à partir de ces modèles ne sont pas totalement représentatives de la situation physiologique.

Les études *in vivo*, utilisant des modèles animaux, permettent d'étudier la physiopathologie de l'infection par HIV dans son ensemble. En effet, certaines espèces animales présentent tout au long de l'infection de nombreuses caractéristiques communes avec celles observées chez l'Homme infecté par HIV, certains animaux développant même une maladie similaire au SIDA humain. Les modèles animaux utilisés pour les études portant sur la biologie de la muqueuse génitale féminine sont principalement la souris, le cochon, le lapin et le singe [192]. Les études portant sur les traitements antirétroviraux ont, quant à elles, majoritairement été effectuées sur les félins, les canins et les singes. Les modèles animaux les plus fréquemment utilisés pour étudier l'infection par le virus de l'immunodéficience sont les singes. Différentes espèces de singes sont utilisées en fonction du virus de l'immunodéficience les infectant et de la pathogénèse induite. En effet, tous les singes infectés par SIV ne montrent pas de pouvoir pathogène particulier, a fortiori d'évolution vers un stade d'immunodéficience. Certaines études utilisant des modèles simiens sont décrites ci-dessous.

Le modèle macaque rhésus, qui peut être infecté par SIV<sub>mac</sub>, HIV-1 ou -2, a été utilisé pour les études sur la transmission hétérosexuelle [212] et les tests de vaccins et microbicides [212]. Il a permis de montrer que SIV entre dans la muqueuse vaginale 60 min après exposition [213]. Ce sont des modèles semblables à la muqueuse génitale féminine humaine au niveau des populations de cellules cibles, de la physiologie et de l'immunologie [212]. Les macaques rhésus peuvent aussi être infectés par une version humanisée de SIV : SHIV (Simian-Human Immunodeficiency Virus) [255], qui est un virus chimérique simien et humain obtenu par substitution des régions codantes *tat*, *rev* et *env* de SIV par celles de HIV-1. Le macaque rhésus infecté par SHIV est un excellent modèle *in vivo* pour étudier l'influence de l'enveloppe virale (en fonction du tropisme) sur la pathogénèse de HIV [255]. L'infection par SHIV pathogène peut induire un état d'immunodépression intense avec une perte massive des LT CD4 périphériques, bien plus radicale que celle observée avec HIV-1 [255]. Cela

permet d'émettre des réserves quant à la fiabilité du modèle pour certaines études. Le modèle macaque cynomolgus est également un excellent modèle simien pour étudier la transmission sexuelle de HIV ; il a notamment été utilisé Sallé et coll. pour étudier la transmission par voie vaginale de HIV [222]. Ce modèle simien présente de nombreuses similarités avec l'infection humaine, dans le cadre d'une infection par HIV/SIV, notamment au niveau de la nature des organes et cellules infectés, des réponses immunes et de la progression de la maladie vers le stade SIDA [157]. Le modèle chimpanzé femelle est également capable d'être infecté par HIV-1 cultivé *in vitro* par voie vaginale [256].

L'utilisation d'un modèle simien pour des infections virales étant difficile en termes de prise en charge, couteuse et très règlementée, Masurier et coll. ont utilisé un modèle souris. Les souris ne sont pas infectables par HIV ; en revanche, elles représentent un bon modèle pour tester de nouvelles stratégies préventives contre ce virus. En effet les modèles souris sont très bien caractérisés ; il est donc possible de marquer et suivre les cellules d'intérêt par un simple marquage utilisant des anticorps spécifiques. Les auteurs ont étudié l'implication des LC dans le transport de HIV dans les ganglions lymphatiques : en présence de LC, HIV est retrouvé dans les ganglions lymphatiques 24h après mise en contact au niveau vaginal ; à l'inverse, HIV n'est pas retrouvé dans les ganglions lymphatiques en absence de LC [257].

Les modèles animaux sont de très bons outils, largement utilisés en biologie pour l'étude de comportements cellulaires et moléculaires dans divers domaines, et notamment dans l'étude de la transmission sexuelle de HIV. Cependant, ces modèles présentent certaines divergences de mécanismes avec ceux observés chez l'Homme (Tableau 4) [184,185]. Miller et coll. ont par exemple montré en 1992 dans un modèle macaque rhésus infecté par SIV, que le virus majoritairement transmis lors d'une infection hétérosexuelle est le virus libre séminal [258]. En revanche il a été démontré chez l'humain (*in vitro* et *ex vivo*) que c'est le virus associé aux cellules du sperme qui est transmis préférentiellement dans le cadre d'une contamination hétérosexuelle [204,254]. Cela indique qu'il faut rester prudent dans l'interprétation des résultats obtenus, et dans leur extension à la situation physiopathologique humaine, quel que soit le type de modèle utilisé.

**Tableau 4: Synthèse comparative des principaux avantages et limites observés dans l'utilisation des différents types de modèles de muqueuses génitales féminines *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.**

Modèle de muqueuse	Modèles <i>in vitro</i>	Modèles <i>ex vivo</i>	Modèles <i>in vivo</i>
Obtention	Facile/ lignées cellulaires ou cellules primaires	Faible disponibilité des tissus / explants humains	Difficile / animaux
Coût	Peu coûteux	Moyennement coûteux	Souvent très coûteux à l'achat et l'entretien
Reproductibilité	Très bonne	Forte hétérogénéité inter-explant	Hétérogénéité inter-animaux (surtout si faible nombre)
Respect de la polarisation	Oui	Oui	Oui
Etanchéité et intégrité de la muqueuse	Conservée	Perte dans le temps	Idéalement conservée
Respect de la structure architecturale	Non	Oui	Oui
Respect de l'environnement cellulaire et microbien	Non, cellules muqueuses uniquement, mais possibilité de complexification	Oui	Oui
Culture à long terme	Possible	Très difficile (maximum 28 jours)	Non applicable
Caractéristiques physiologiques, immunologiques et physiopathologiques	Respect des caractéristiques physiopathologiques	Respect des caractéristiques physiologiques, immunologiques et physiopathologiques	Respect des caractéristiques physiologiques, immunologiques et physiopathologiques
Espèce humaine	Oui	Oui	Non
Commentaires	Possibilité de modulation et de complexification	Cultivés en milieu contenant des antibiotiques et antifongiques	Règlementation lourde ; Etude à l'échelle de l'organisme

Les modèles d'études biologiques décrits ci-dessus présentent tous leurs avantages et leurs limites. Aussi, l'utilisation de l'un ou l'autre de ces modèles est pertinente en fonction de l'étude effectuée et de son stade d'avancement.

# OBJECTIFS DU TRAVAIL



Plus de 34 millions de personnes sont infectés par HIV, qui est l'une des causes de mortalité les plus élevées dans le monde. Même si de grandes disparités sont observées entre les régions, la transmission de HIV-1 s'effectue majoritairement par voie hétérosexuelle (30-40% des nouvelles infections dans le monde chaque année), lors de l'exposition des muqueuses génitales féminines saines aux sécrétions séminales masculines infectées. Plus de 50% des personnes infectées sont des femmes (plus de 59% en Afrique sub-saharienne). Entre 15 et 24 ans, le risque d'être infecté est 3 fois plus élevé pour une femme que pour un homme.

Les mécanismes impliqués dans la transmission du virus, immédiatement après exposition jusqu'à l'infection à proprement parler, sont encore mal définis. La transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme implique le dépôt du sperme infecté et le passage du virus au sein de la muqueuse génitale féminine. La barrière muqueuse, composée à plus de 95% de cellules épithéliales, est donc la première protection contre l'infection par HIV. La contamination par voie hétérosexuelle peut avoir lieu au niveau des différentes structures épithéliales du tractus génital féminin (endocol, exocol, vagin). Des traces de sperme sont retrouvées au niveau de l'endocol plusieurs jours après un rapport sexuel. Compte tenu de la fragilité de cette muqueuse, composée d'une monocouche de cellules épithéliales, et des fréquents remaniements (ectopies) dont elle est l'objet, les cellules qui la composent jouent vraisemblablement un rôle important dans la transmission de HIV de l'homme infecté vers la femme.

Il existe une compartimentation entre le secteur sanguin et d'autres espaces anatomiques, notamment le secteur séminal au niveau duquel l'administration d'un traitement antirétroviral n'agit pas toujours aussi efficacement qu'au niveau sanguin. Dans le sperme, le virus est retrouvé sous deux formes : 1) virus libre, dans le plasma séminal (compartiment plasmatique) et 2) virus associé aux cellules, dans les NSMC (compartiment cellulaire). La compartimentation cellulaire joue un rôle important dans la transmission sexuelle, étant donné que les deux types de virus n'ont pas la même origine et ne sont pas transmis de façon identique à travers la muqueuse génitale féminine. En effet, en absence de brèche dans la muqueuse, le virus associé aux cellules peut traverser la muqueuse, principalement par transmigration des NSMC infectées, alors que le virus libre semble plutôt traverser la muqueuse par transcytose à travers les cellules épithéliales génitales, sans induire d'infection. Ces mécanismes de traversée de la muqueuse sont difficiles à étudier et pas clairement élucidés à l'heure actuelle.

La compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme est primordiale pour le développement de nouvelles stratégies de lutte antivirale, telles que les microbicides. L'utilisation des techniques d'étude classiques seules montre

de nombreuses limitations pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de la transmission sexuelle du virus. Ainsi, le développement d'outils et modèles permettant de visualiser directement le passage *trans*-épithélial du virus contenu dans le sperme à travers la muqueuse génitale féminine est de première importance pour investiguer plus avant la transmission hétérosexuelle de HIV.

Divers outils virologiques et techniques de visualisation ont été développées ces dernières décennies afin d'étudier la structure et le cycle de réplication de HIV. L'utilisation de ces outils est indispensable pour comprendre les mécanismes de passage du virus à travers la muqueuse génitale féminine dans le cadre d'une transmission hétérosexuelle, notamment les mécanismes de transmigration et de transcytose, qui semblent primordiaux dans la transmission hétérosexuelle de HIV. Pourtant la construction et l'utilisation de ces outils impliquent de nombreuses difficultés techniques, notamment en termes de biologie moléculaire et de visualisation du virus (qui présente une taille de l'ordre de 100 nm). La microscopie électronique ne permet pas de répondre aux questions posées quant aux mécanismes de transmission hétérosexuelle de HIV, rendant nécessaires le développement et l'utilisation de techniques de visualisation directe de l'infection des muqueuses génitales féminines par le virus.

Dans cet objectif, nous avons utilisé dans un premier temps un modèle *in vitro* de muqueuse endocervicale et visualisé par microscopie confocale les mécanismes de passage du virus associé aux cellules à travers la monocouche de cellules épithéliales génitales endocervicales, et étudié le rôle de la transmigration dans la sélection à tropisme R5.

Dans un second temps, nous avons construit un virus HIV chimérique réplcatif et infectieux, exprimant soit la protéine fluorescente eGFP, soit la protéine fluorescente dsRedExpress. Ce virus chimérique nous a permis de visualiser par microscopie confocale l'infection de cellules endocervicales par des souches de HIV à tropisme X4 ou R5. Par la suite, nous avons développé et utilisé un algorithme mathématique permettant de segmenter les contours cellulaires et les particules virales, afin de quantifier et de localiser la présence du virus dans la monocouche épithéliale. Ces virus chimériques, infectieux et détectables par microscopie confocale après plusieurs cycles de réplication, combinés avec l'analyse mathématique développée, sont d'excellents outils pour l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV et l'évaluation de nouvelles stratégies de traitement curatifs ou prophylactique au niveau de la muqueuse génitale féminine (e.g. microbicides).

# RESULTATS EXPÉRIMENTAUX

# Article I: Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma

Philip Lawrence<sup>1\*</sup>, Didier Portran<sup>1\*</sup>, Rachel Terrasse<sup>1</sup>, Sabine Palle<sup>2</sup>, Thomas Olivier<sup>2</sup>, Jacques Fantini<sup>3</sup>, Thomas Bourlet<sup>1</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1</sup>, and Olivier Delezay<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP-EA 3064), PRES de Lyon, Université Jean Monnet, IFRESIS et CHU de Saint-Etienne ; <sup>2</sup>Centre de Microscopie Confocale Multi photonique, PRES de Lyon, Université Jean Monnet, Pôle Optique et Vision, Saint-Etienne ; <sup>3</sup>CRN2 M, CNRS UMR 6231, INRA USC 2027, Laboratoire des Interactions Moléculaires et Systèmes Membranaires, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France.

*Publié dans : AIDS 2012 [259].*

## **I. But de l'étude**

La transmission hétérosexuelle est la cause majeure de nouvelles contaminations par HIV dans le monde. Ce mode de transmission implique le contact entre le sperme infecté et la muqueuse génitale féminine saine, où sont regroupées de nombreuses cellules cibles de HIV. Ce virus est présent sous deux formes dans le sperme : i) virus libre, dans le plasma et ii) virus associé aux cellules, dans les NSMC, composées majoritairement de macrophages [16,202].

Il a été montré qu'il existe une sélection de virus à tropisme R5 lors de la transmission de HIV. En effet, lors de la primo-infection, les virus à tropisme R5 sont majoritairement retrouvés dans l'organisme infecté, alors que les virus à tropisme X4 apparaissent plus tard dans la maladie [148]. Le sperme d'hommes infectés contient à la fois des virus (libres et associés aux cellules), de tropisme X4, R5 ou dual-tropiques [44]. La sélection des souches à tropisme R5 observée lors de la transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme semble donc intervenir dès le franchissement de la muqueuse génitale féminine qui est la première barrière contre l'infection.

La muqueuse endocervicale est particulièrement importante dans la transmission hétérosexuelle de HIV puisqu'elle est constituée, à plus de 95%, d'une monocouche de cellules épithéliales et représente une barrière fine entre la région sous-muqueuse, qui contient les cellules immunitaires de l'hôte, et le milieu extérieur où le sperme infecté entre en contact avec la muqueuse. De plus, elle est souvent le siège de remaniements ou ectopies qui la fragilisent.

Le plasma séminal est composé de nombreux facteurs influençant le passage du virus à travers la muqueuse génitale féminine, notamment en induisant le recrutement au niveau de la muqueuse de cellules immunitaires telles que des leucocytes, des LC et des polynucléaires neutrophiles [199,208,210]. Le sperme contient également de nombreuses cytokines pouvant jouer un rôle soit pro- soit anti-HIV, telles que le TGF- $\beta$ 1 [16,191,207,209,210]. Ainsi, l'impact, facilitateur ou inhibiteur du plasma séminal dans la transmission hétérosexuelle de HIV et la sélection de virus à tropisme R5 sont mal compris.

Plusieurs voies de passage du virus à travers la muqueuse génitale infectée ont été démontrées [167,191]. Ainsi, le virus libre peut traverser la muqueuse génitale féminine par transcytose à travers les cellules épithéliales génitales féminines, sans induire d'infection [196], alors que les NSMC infectées sont capables de traverser la muqueuse génitale féminine par transmigration, qui semble être le mode de transmission du virus associé aux cellules le plus efficace [221]. Cependant, les mécanismes impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV ainsi que la sélection R5 et l'implication du virus libre ou associé aux cellules dans ce processus ne sont pas encore clairement compris [15,167,191].

La compréhension des mécanismes exacts régissant la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme est primordiale pour le développement de nouvelles stratégies de traitement et de protection vis-à-vis de l'infection, au niveau de la muqueuse génitale féminine, tels que les microbicides. Ainsi, dans cette étude nous avons, dans un premier temps, cherché à déterminer et visualiser le rôle de la transmigration de cellules infectées à travers la muqueuse génitale endocervicale. Pour cela nous avons utilisé un modèle *in vitro* de muqueuse endocervicale, et visualisé par microscopie confocale la transmigration de monocytes/macrophages et LT infectés. La transmission hétérosexuelle de HIV ayant lieu, *in vivo*, en présence de sperme, nous avons dans un second temps étudié le rôle du plasma séminal au cours de la transmigration de cellules infectées à travers la muqueuse génitale de l'endocol.

## II. Article publié

# Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma

Philip Lawrence<sup>a,\*</sup>, Didier Portran<sup>a,\*</sup>, Rachel Terrasse<sup>a</sup>, Sabine Palle<sup>b</sup>, Thomas Olivier<sup>b</sup>, Jacques Fantini<sup>c</sup>, Thomas Bourlet<sup>a</sup>, Bruno Pozzetto<sup>a</sup> and Olivier Delezay<sup>a</sup>

**Objective:** To analyse the transmigration of immune cells infected by HIV-1 across the epithelial monolayer using the endometrial human endometrial carcinoma (HEC)-1A cell line and to study the influence of seminal plasma in this process.

**Design:** After sexual intercourse involving a male partner infected by HIV-1, a selection process has been shown to lead to a predominant transmission of the R5 phenotype despite the presence of X4 and R5 strains in semen. Transmigration of HIV-infected monocytes present in semen may represent a pertinent mechanism that could explain this tropism selection.

**Methods:** Epithelial monolayer crossing was studied by using HEC-1A epithelial cells cultured on permeable support and monocyte-enriched or lymphocyte-enriched populations of cells infected or not by HIV R5 or X4 strains. Transmigrating cells were quantified and analysed for their ability to transmit HIV infection to immune target cells. The effect of HIV-negative seminal plasma on cell transmigration was analysed.

**Results:** A preferential passage of the R5 strain associated with monocyte-enriched populations was observed together with the ability of this strain to transmit infection. Seminal plasma was found able to decrease the epithelial crossing of immune cells by enhancing transepithelial resistance and by increasing the adherence of immune cells to the monolayer.

**Conclusion:** The preferential transmigration of HIV R5 strains associated with monocytes across the endocervical monolayer may explain the predominant transmission of the R5 strains after sexual intercourse. By its capacity to modulate the tightness of the epithelial structure, seminal plasma reinforces this selection process.

© 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

*AIDS* 2012, **26**:785–796

**Keywords:** heterosexual infection, HIV-1, lymphocytes, monocytes, seminal plasma, transmigration, tropism selection

## Introduction

Heterosexual intercourse is the major mode of HIV-1 transmission worldwide. HIV-1, present in the sperm as

free or cell-associated particles, interacts with the female genital mucosa, crosses it and joins the blood circulation under the epithelium, leading to dissemination of the virus and systemic infection. Viruses present in the

<sup>a</sup>Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP-EA 3064), PRES de Lyon, Université Jean Monnet, IFRESIS et CHU de Saint-Etienne, <sup>b</sup>Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique, PRES de Lyon, Université Jean Monnet, Pôle Optique et Vision, Saint-Etienne, and <sup>c</sup>CRN2 M, CNRS UMR 6231, INRA USC 2027, Laboratoire des Interactions Moléculaires et Systèmes Membranaires, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France.

Correspondence to Bruno Pozzetto, MD, PhD, GIMAP-EA 3064, Faculté de Médecine J. Lisfranc, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne Cedex 02, France.

Tel: +33 4 77 82 84 34; fax: +33 4 77 82 84 60; e-mail: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

\* Philip Lawrence and Didier Portran contributed equally to the writing of this article.

Received: 28 August 2010; revised: 22 December 2011; accepted: 10 January 2012.

DOI:10.1097/QAD.0b013e328351426e

ISSN 0269-9370 © 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins 785  
Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.



seminal fluid include both X4 and R5 strains that infect preferentially lymphocytes and macrophages, respectively, according to their coreceptor usage [1,2]. However, a selection process has been shown to lead to a predominant transmission of the R5 phenotype [3–5]. In the absence of a breach in the mucosa, caused by an existing sexually transmitted infection, inflammation or trauma, HIV can exploit the normal defence mechanisms of the host immune system. In this way, it has been suggested that CD4-positive cells of the host immune system present in mucosa or submucosa, including Langerhans cells, T cells and monocytes–macrophages, could be the main targets of the virus [6–9]. In the genital mucosa, Langerhans cells and the majority of T cells and macrophages express CXCR4 and CCR5, suggesting that these cells are not directly involved in the selection of R5 strains [9]. It has been also demonstrated *in vitro* that HIV-1 can cross a monolayer of endocervix-derived cells [10,11] or a pseudo-monolayer of primary female genital exocervical mucosa [12] by transcytosis or that HIV can directly infect the epithelial cells themselves [13,14].

A further hypothesis involves the passage of cell-associated virus through the mucosa by transmigration of infected mononuclear cells present in semen. This mechanism has been shown via numerous *in-vitro* and *ex-vivo* models using infected monocytes with cervical derived cell lines or explants [15–18] and *in-vivo* mouse [18–21] or, very recently, macaque models [22]. All these studies argue in favour of a possible role of the transmigration of seminal immune cells across the female genital mucosa. The observation that monocytes are the main immune cell population present in the semen is highly relevant for their involvement in HIV epithelial crossing as well as selective R5 HIV transmission [23,24]. However, the potential role of transmigration in the selection of R5 strains during heterosexual transmission is poorly documented.

In addition to its role as a vehicle for HIV particles, the semen itself must also be considered as a potential factor capable of influencing HIV epithelial crossing. The ability of seminal plasma (semen acellular fraction) to enhance HIV transmission has been demonstrated by its capacity to augment immune cell recruitment to sites of semen exposure [25,26] and to increase infectivity even with low viral titres [27,28]. Furthermore, the rich cytokine content of semen can further influence a host immune response and infection by HIV [29,30]. However, the role of semen in transmission of cell-associated virus and its potential effect on the selection of R5 strains during heterosexual intercourse have not been well evaluated. Moreover, it has been suggested that cell-associated virus may be more resistant to the innate immune defences of the female genital tract than free virus [31].

Using a permeable culture support system and the human cell line human endometrial carcinoma (HEC)-1A,

representative of the endocervical epithelial structure, we studied the transmigration of immune cells across the epithelial monolayer. Our results support a potential role of the preferential transmigration of monocytes in the transmission of R5 strains. In addition, the ability of seminal plasma to increase transepithelial electrical resistance (TEER) of the monolayer and to favour the adhesion of leukocytes to the epithelium, could decrease leukocyte transmigration and further reinforce the selective crossing of monocyte-associated HIV strains.

## Methods

### HIV-1 strains and seminal samples

Two laboratory strains, HIV-1<sub>MN</sub> (X4-lymphocytotropic) and HIV-1<sub>BAL</sub> (R5-monocytotropic), and three primary isolates, UG001 (dual-tropic), US660 (R5-monocytotropic) and SF162 (R5-monocytotropic), were used (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program). Cell-free virus was produced by infection of IL2/phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Semen was obtained from HIV-negative patients via the Reproduction Biology Department of the University Hospital of Saint-Etienne after written, informed consent of the patients. Seminal plasma was recovered by gentle centrifugation, pooled and frozen at –80°C until used. In transmigration experiments, cells were preincubated for 16 h with this fluid diluted 1:15 in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (PAA, Les Mureaux, France).

### Cell culture and measure of transepithelial electrical resistance

The human endometrial cell line HEC-1A was cultured in DMEM/F12, supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (AbCys, Paris, France) and 1% antibiotic/antimycotic solution (PAA). Seven days prior to transmigration experiments, cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per filter in 12-well or 6-well plates containing cell culture inserts (BD Falcon, Le Pont de Claix, France) with a 3 µm pore size. Cell culture inserts were maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Cells formed a polarized, confluent monolayer in 7 days, as confirmed by testing the TEER between the apical and basal compartments using a homemade transepithelial electrophysiological system as previously described [32]. Values of 200 and 100 Ω.cm<sup>2</sup>, typically observed for 12-well and 6-well format inserts, respectively, were chosen to indicate a significant TEER. Confluent HEC-1A cell culture inserts were used between days 7 and 10 of culture. The addition of 0.2% (w/w) of nonoxinol-9 (N-9), a detergent known to disrupt epithelial cell layers, caused a rapid and irreversible decrease in the TEER.

U373MG-CD4 reporter cells, a kind gift from Marc Alizon (INSERM U332, Paris, France), were used in

some experiments. These cells express the chemokine receptors CCR5 or CXCR4 and contain an HIV-1 long terminal repeat-LacZ cassette allowing a Tat-induced expression of  $\beta$ -galactosidase [33]. Referred to here as U373-R5 and U373-X4 cells, respectively, they were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics in the presence of 10  $\mu$ g/ml of puromycin and 100  $\mu$ g/ml of hygromycin-B.

#### Human peripheral blood mononuclear cell isolation, peripheral blood monocytes/peripheral blood lymphocytes preparation and HIV-1 infection

Human PBMCs, obtained from healthy donors (French blood bank, EFS Auvergne-Loire) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and antibiotics. Monocyte-enriched (peripheral blood monocytes; PBM) and lymphocyte-enriched (peripheral blood lymphocytes; PBL) fractions were obtained as described by Repnik *et al.* [34], with minor modifications. Briefly,  $2 \times 10^8$  PBMCs were placed onto 10 ml of a hyperosmotic Percoll (Sigma-Aldrich, Lyon, France) solution (48.5% Percoll, 10% 1.6 mol/l NaCl) and centrifuged at 580g for 15 min. The cell pellet containing the lymphocytes was washed and resuspended in culture medium. The monocyte-containing upper part of the gradient was removed, washed three times and resuspended in culture medium. After 16 h of culture, nonadherent cells were removed and the medium replaced. Using flow cytometry, PBL and PBM were shown to contain at least 95% lymphocytes and more than 70% monocytes, respectively. Cell activation was carried out 2 days before virus infection by the addition of 5  $\mu$ g/ml of PHA-P (Sigma-Aldrich) and 20 U/ml of IL-2 (AbCys). PBM and PBL were incubated with 200 TCID<sub>50</sub> (as determined with PBMCs) of HIV-1<sub>BaL</sub> or HIV-1<sub>Mu</sub>. The viral inoculum was removed after 48 h and the cells were washed twice with culture medium and incubated for a further 5 days before use in transmigration experiments.

Seven days after infection, the amount of macrophages (CD68 positive cells) found in PBM was 27% and the level of monocytes (CD14-positive cells) was more than 75% as measured by flow cytometry experiment; to differentiate from the uncultured cells, this population was called 'monocyte-macrophage cells'. In each independent experiment, leukocyte concentrates were obtained from a different blood donor.

The amount of proviral DNA in cells infected by HIV-1 was quantified prior to their use in transmigration assays by a real-time PCR technique using an Applied Biosystems 7500 automate, as described previously [35].

#### Transmigration experiments

The transmigration experiments were performed as described by Chancey *et al.* [18] with modifications.

Noninfected PBMCs, PBM and PBL fractions fluorescently marked with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) were placed at the concentration of 800 000 cells in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts kept for 24 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. The number of transminating cells was evaluated using an Ascent Fluoroskan automate (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France) with an excitation at 488 nm and readout at 590 nm. Fluorescent beads (BD Biosciences) were used as a control of passive migration. Basal cells or beads were quantified using a series of dilutions of known numbers of CFSE-labelled leukocytes/beads.

In other experiments, HIV-1-infected leukocyte populations (100 000 HIV DNA copies for  $2 \times 10^6$  cells) or cell-free virus (5 ng p24) were placed in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts kept for 24 h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Cells from the basal compartment were pelleted by centrifugation, counted and tested for viability by trypan blue staining (Sigma-Aldrich). HIV-1 p24 Ag was quantified by ELISA as described previously [36] with a sensitivity of approximately 20 pg/ml of p24 protein. Proviral DNA in basal cells was quantified as described above.

For transmigration experiments involving HIV primary isolates, PBM were infected with each strain as described above. Infected cells were placed in the apical compartment and HIV DNA proviral copies found in the basal compartment were quantified by real time-PCR after 24 h. The results were expressed as the ratio between HIV DNA proviral copies found in the basal compartment and the number of HIV DNA proviral copies deposited in the apical compartment.

#### Determination of viral phenotropism by U373 reporter cell tropism test

In some experiments, basal cells were collected, washed by centrifugation and resuspended with fresh, IL2/PHA-activated PBMCs in 96-well plates; 48 h later, the cells were washed and fresh medium containing IL-2 and PHA was added; after culture for a further 8-day period, the supernatant was quantified for p24 Ag by ELISA and the viral content tested for reporter cell tropism. The co-receptor usage and infectivity of amplified viral strains was determined by measurement of chlorophenol-red- $\beta$ -D-galactopyranoside cleavage in the reporter cell lines U373-X4 and U373-R5 by comparison with cells exposed to supernatant from uninfected cells, as described previously [37]. Optical densities greater than twice the background value were considered as positive.

#### Fluorescent microscopy

Following different experiments, confluent HEC-1A cells were fixed in 3.7% PFA-PBS for 12 h and then incubated for 20 min in 50 mmol/l NH<sub>4</sub>Cl to quench free aldehydes and for another 20 min in 0.4% Triton



X100–PBS. The cells were then incubated for 1 h with the following reagents: CD45–fluorescein isothiocyanate (FITC; clone H130), CD14–phycoerythrin (clone M5E2), CD26–phycoerythrin, CD26 (clone M-A261) and zonular occludens 1 (ZO-1; clone 1) from BD Pharmingen, antimouse Alexa Fluor 555 and diamindino 2 phenylindole (DAPI) for nuclear staining from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), diluted in PBS containing 10% FCS. Following washing steps, cell culture insert membranes were removed, mounted in Fluoprep medium (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) and left overnight at 4°C. Cells were analysed with either a Nikon fluorescent microscope or a Leica (Leica Microsystems, Nanterre, France) TCS-SP2 confocal scanning laser microscope used with pulsed near infrared excitation (multiple photon mode) and software. The excitation laser was a COHERENT MIRA 900 with a 76 MHz repetition rate and a 790 nm wavelength. Images and image stacks were analysed using ImageJ software [38].

## Results

### Monocytes cross a tight human cervical epithelial monolayer more efficiently than lymphocytes

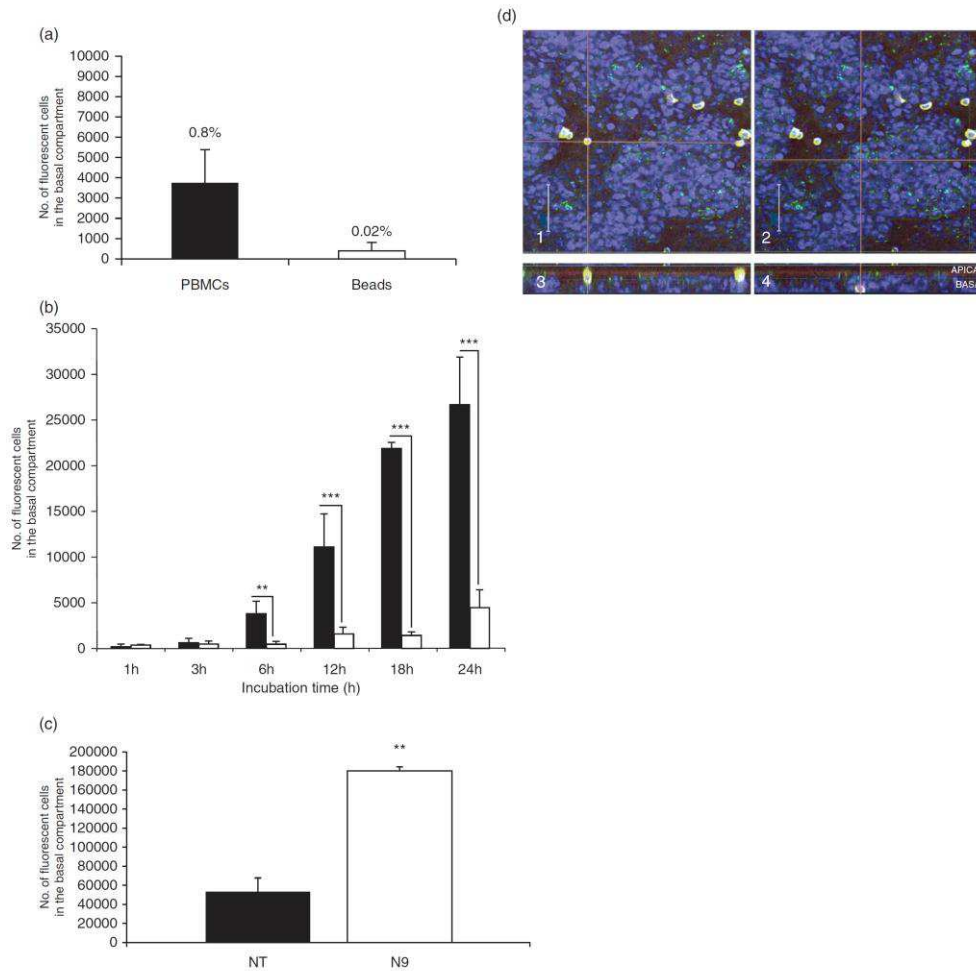
To evaluate leukocyte migration across the tight monolayer of HEC-1A, 500 000 PBMCs (or fluorescent beads) were placed in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts and incubated at 37°C for 24 h. As illustrated in Fig. 1a, leukocytes were able to cross the HEC-1A monolayer (0.8% of the initial apical population) in contrast to the fluorescent beads (0.02% of initial apical fluorescence), suggesting the active transmigration of immune cells. Similar experiments were undertaken using PBM or PBL. After 6 h, there was a significant difference between the numbers of transmigrated cells depending on the nature of the cells deposited in the apical compartment. This difference increased over time, strongly suggesting a preferential transmigration of monocytes compared with lymphocytes (Fig. 1b). The pretreatment of confluent HEC-1A cell culture inserts with 0.01% (w/w) N-9 allowed the passage of significantly more PBMCs ( $1.8 \times 10^5$  cells, 18% of the initial apical population versus  $5.4 \times 10^4$ , 5.4%,  $P < 0.01$ ) (Fig. 1c), illustrating the dependency of the integrity of the monolayer on its ability to provide an efficient barrier to passive cellular epithelial crossing. The selective transmigration of monocytes across the monolayer was confirmed by confocal microscopy experiments: monocytes were found on the epithelial apical surface as well as between cells, whereas lymphocytes were only found on the apical side of the monolayer (Fig. 1d). Despite a relative heterogeneity of nuclear staining, the epithelial monolayer was confluent as demonstrated by a significant level of TEER.

Additional experiments were performed for evaluating the ability of long-term cultured (11 days) monocytes–macrophages, activated or not by IL-2 and PHA, to migrate across the cell monolayer. No difference in the amount of migrated cells was observed by comparison to a population of freshly magnetically sorted monocytes (more than 95% of CD14<sup>+</sup> cells).

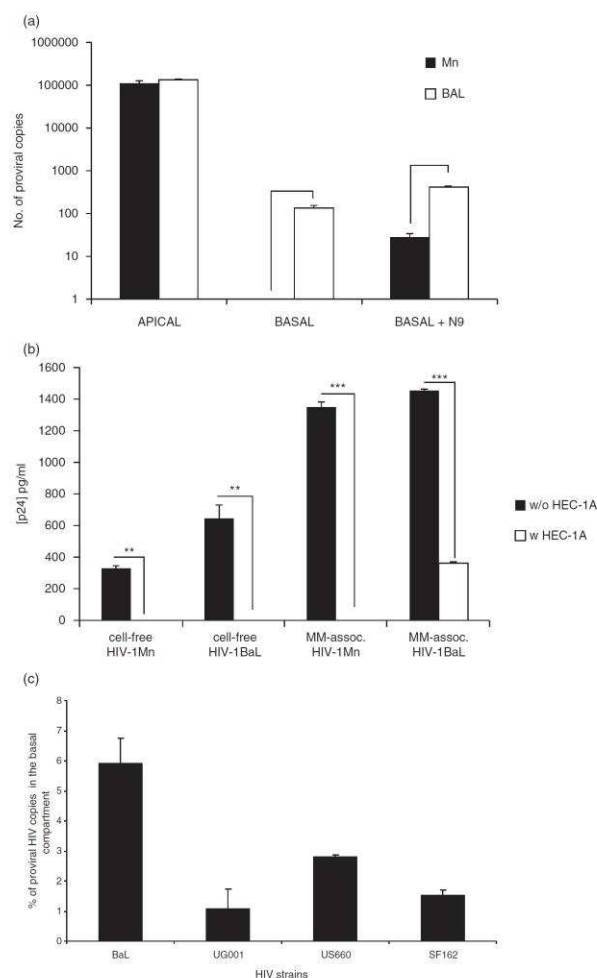
### Cell-associated monocytotropic viruses cross the cervical epithelium more efficiently than cell-associated lymphocytotropic viruses or cell-free virus

To evaluate the passage of cell-associated HIV via transmigration, PBM populations were infected with monocytotropic strain HIV-1<sub>BaL</sub> or lymphocytotropic strain HIV-1<sub>Mn</sub> as described above. After quantification of proviral DNA,  $2 \times 10^6$  cells containing 100 000 proviral copies from each of these infected monocytes–macrophages cells were placed in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts. Culture inserts were pretreated or not with 0.01% (w/w) N-9 as control of passive passage. As shown in Fig. 2a, after 24 h, passage of viral DNA was observed in the basal compartment uniquely for monocytes–macrophages cells infected with HIV-1<sub>BaL</sub>, despite the presence of an equivalent number of cells in the basal compartment for the two groups. After treatment with N-9, a nonselective passage of both strains was observed (Fig. 2a), strongly suggesting that it was the epithelial monolayer that provided the selective barrier to leukocyte transmigration. By contrast to cell-associated virus, both cell-free HIV-1<sub>BaL</sub> and HIV-1<sub>Mn</sub> were unable to cross the epithelial monolayer under our experimental conditions (data not shown). The absence of TEER change (measured before and after each transmigration experiment) excluded the modulation of monolayer integrity by immune cells. In the same way, addition of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  (up to 20 ng/ml) or tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (up to 100 ng/ml) in the apical compartment for 24 h was not associated with a decrease in TEER (data not shown).

Additional experiments were performed to investigate whether transmigrated cells were able to generate virions and to productively infect other leukocytes. Cells present in the basal compartment after 24 h were pelleted by centrifugation, washed, incubated with fresh IL-2/PHA-activated PBMCs and cultured for 10 days. As control for cell-free virus, the basal culture medium was also incubated with activated PBMCs. As shown in Fig. 2b, detectable p24 protein was observed uniquely for monocytes–macrophages-associated HIV-1<sub>BaL</sub>. By contrast, cell-free viruses were unable to cross the epithelial monolayer, as evidenced by the absence of detectable p24 antigen after 10 days of culture of activated PBMCs with basal medium from confluent HEC-1A cell culture inserts incubated with cell-free virus (Fig. 2b). In addition, the incubation of the same PBMC culture supernatants with the reporter cell lines U373-X4 or



**Fig. 1. Transmigration of leukocytes across confluent human endometrial carcinoma-1A cell culture inserts.** Panel (a): number of cells (black bar) or beads (white bar) found in the basal compartment after 24 h of culture at 37°C, following the deposition of  $8 \times 10^5$  PBMCs or beads in the apical compartment of confluent human endometrial carcinoma (HEC)-1A cell culture inserts. Results are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Percentages represent the number of transminating cells or beads compared with the total number of cells or beads added to the apical compartment. Panel (b): number of monocyte-enriched (PBM, black bars) or lymphocyte-enriched leukocytes (PBL, white bars) found in the basal compartment after 24 h of culture at 37°C, following the deposition of  $8 \times 10^5$  cells in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts. Results are mean  $\pm$  SD of two independent experiments. Triple asterisks (\*\*\*) and double asterisks (\*\*) are  $P < 0.001$  and  $0.01$ , respectively, by Student's *t*-test. Panel (c): number of cells found in the basal compartment after 16 h of culture at 37°C, following the deposition of  $1 \times 10^6$  PBMCs in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts pretreated (white bar) or not (black bar) with 0.01% nonoxynol 9 for 15 min. Results are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Double asterisk (\*\*) are  $P < 0.01$  by Student's *t*-test. Panel (d): analysis by confocal microscopy of the transmigration of monocyte-enriched leukocytes across confluent HEC-1A cell culture inserts after 4 h of culture at 37°C, following the deposition of  $5 \times 10^5$  cells in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts. Cell culture inserts were washed, fixed with 3.7% PFA for 1 h and labelled with CD45-FITC (green), CD14-phycoerythrin (red) antibodies and DAPI (nuclear staining, blue); double-marked CD45<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> cells appear in yellow. Transverse z-plane sections for which the relative position is indicated on the top view of the apical face of the epithelial monolayer by orange lines (panels 1 and 2) are shown in panels 3 and 4, respectively. Bar = 50 μm.



**Fig. 2. Transmigration of monocyte-macrophages (MMs) infected by strains of HIV-1 across a confluent human endometrial carcinoma-1A monolayer.** Panel (a): 2 million of MM-enriched leukocytes containing 100 000 proviral copies of HIV-1<sub>BaL</sub> (white bars) or HIV-1<sub>Mn</sub> (black bars) was placed in the apical compartment of confluent human endometrial carcinoma (HEC)-1A cell culture inserts. After a culture period of 24 h at 37 °C, the viral load was quantified in cells present in the basal compartment. In certain experiments, filters were preincubated with 0.01% N9 15 min before the addition of infected cells. Results are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Double asterisks (\*\*) and asterisk (\*) are  $P < 0.01$  and  $0.1$ , respectively, by Student's *t*-test. Panel (b): in order to control the ability of cell-free or cell-associated crossing virus to infect PBMCs, free virus (5 ng p24) or 800 000 MM-enriched leukocytes infected as in panel (a) were placed in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts (white bars); empty cell culture inserts were used as controls (black bars). After a culture period of 24 h at 37 °C, basal culture medium for cell-free virus or washed transminating cells were incubated with fresh, IL2/PHA activated PBMCs in 96-well plates. After 10 days of culture, PBMC supernatants were tested for the presence of HIV-1 p24 Ag. Results are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Triple asterisks (\*\*\*) and double asterisks (\*\*) are  $P < 0.001$  and  $0.01$ , respectively, by Student's *t*-test. Panel (c): MM-enriched leukocytes were infected by HIV-1<sub>BaL</sub> (370 000 proviral copies per  $3 \times 10^6$  cells) and three primary isolates of HIV-1 ( $3.1 \times 10^6$ ,  $3.4 \times 10^6$  and  $5.1 \times 10^6$  proviral copies per  $3 \times 10^6$  cells for UG001, US660 and SF162, respectively). The cells were placed in the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts. After a culture period of 24 h at 37 °C, the viral load was quantified in cells present in the basal compartment. Results are expressed as percentage of transmigrated proviral copies from two independent experiments.



U373-R5 confirmed the observation that only PBM-associated HIV-1<sub>BaL</sub> proved to be infectious after transmigration across the HEC-1A monolayer (data not shown).

Transmigration experiments were also performed with PBM infected with primary isolates. As shown in Fig. 2c, the percentage of proviral HIV DNA found in the basal compartment was variable but significant whatever the isolate considered.

#### Decreased transmigration of leukocytes in the presence of seminal plasma

Similar transmigration experiments were conducted in the presence of human seminal plasma from HIV-negative donors. After 24 h, a 60% decrease in the number of transmigrated PBM present in the basal compartment was observed in the presence of seminal plasma (Fig. 3). PBM infection by HIV-1<sub>BaL</sub> or HIV-1<sub>Mn</sub> did not modify the ability of seminal plasma to reduce leukocyte crossing through the monolayer (data not shown).

#### Seminal plasma increases the transepithelial resistance of the human cervical epithelial monolayer and leukocyte adhesion on the epithelial cell monolayer

The addition of seminal plasma to the apical compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts (six-well format) caused a rapid (after 15 min) increase in the TEER of the monolayer (average of  $108.4 \pm 10.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  for nontreated cells vs.  $209.9 \pm 51.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$  for those treated with seminal plasma,  $P < 0.001$ ), and the

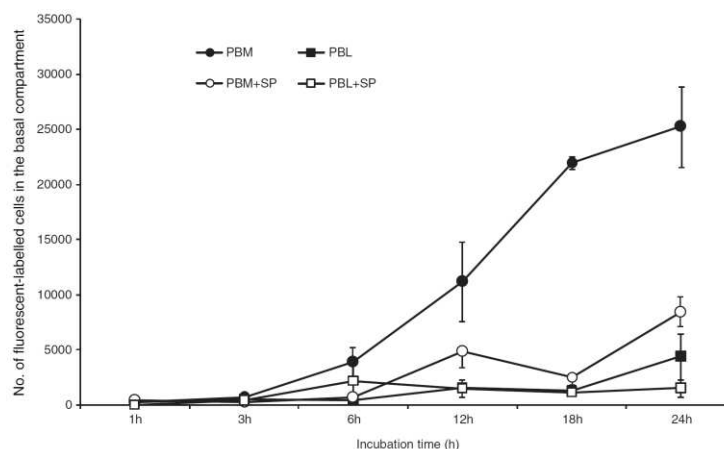
subsequent addition of N-9 caused a rapid decrease in TEER, demonstrating the biological nature of this phenomenon (Fig. 4a). This effect was shown to be stable as cells treated by seminal plasma displayed a significantly elevated TEER after 18 h of treatment when compared with nontreated controls ( $176.3 \pm 47.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  for cells treated with seminal plasma vs.  $103.5 \pm 11.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  for nontreated cells,  $P < 0.01$ ).

In agreement with these results, an increase in the cellular expression and distribution of ZO-1, a component of the tight-junction complex involved in cell-cell interactions and maintaining a tight epithelial monolayer, was observed by confocal fluorescent microscopy (Fig. 4b). This effect was relatively specific, as no change was observed for other markers such as CD26, CXCR4 or HLA (data not shown).

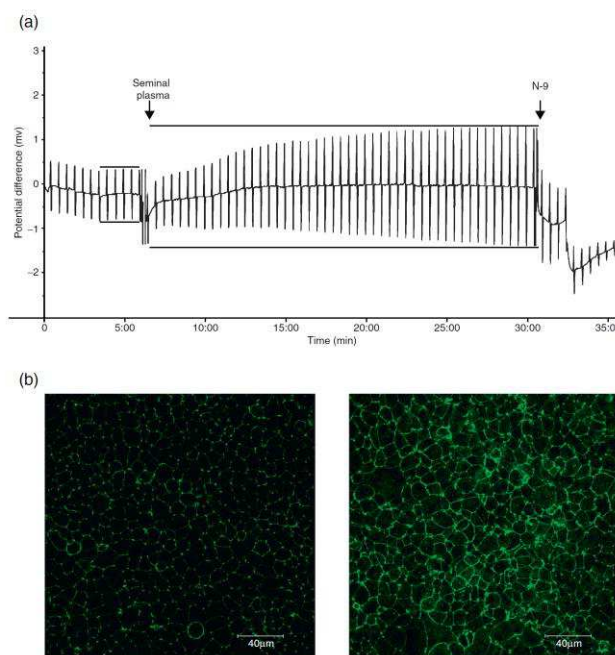
Seminal plasma was also shown to increase the number of leukocytes that adhere to the HEC-1A monolayer (Fig. 5). This effect was observed for PBM as well as for PBL and was not correlated with a change in CD11a and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression on PBM and epithelial cells, respectively (data not shown).

#### Discussion

HIV heterosexual infection is associated with a tropism selection leading to preferential R5 virus transmission despite the presence of X4 and R5 strains in semen [39]. The mechanisms involved in this selective contamination



**Fig. 3. Evaluation by quantitative fluorescent microscopy of the reduction of leukocyte transmigration after pretreatment with HIV-negative seminal plasma.** Eight hundred thousand monocyte-enriched (circles) or lymphocyte-enriched cells (squares), treated (open shapes) or not (closed shapes) with HIV-negative seminal plasma for 16 h prior to transmigration assay were placed in the apical compartment of confluent human endometrial carcinoma (HEC)-1A cell culture inserts and cultured at 37°C. At each time point, cells present in the basal compartment were pelleted by centrifugation and immunolabelled (CD45-phycoerythrin) before quantification by fluorescent microscopy with ImageJ software. Results are mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



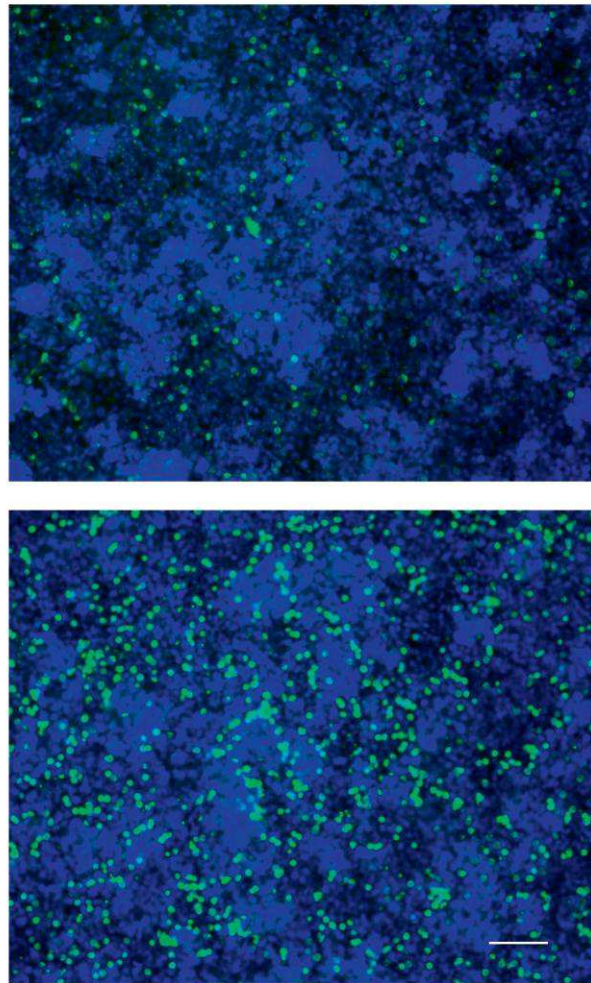
**Fig. 4. Evaluation of HIV-negative seminal plasma on epithelial human endometrial carcinoma (HEC)-1A monolayer tightness.** Seminal plasma was diluted 1/15 in complete DMEM/F12. Panel (a): measurement of the transepithelial electrical resistance (TEER). N-9 (0.2%, w/w) was added to verify the involvement of epithelial cells in the TEER increase; the results shown are representative of eight independent experiments. Panel (b): immunodetection of the tight-junction component ZO-1 using a Leica TCS-SP2 confocal scanning laser microscope. The images were obtained in the absence (left picture) or in the presence (right picture) of seminal plasma. Bar = 40 µm.

are still unclear as well as the respective part of cell-free and cell-associated virus in the HIV contamination process [40]. Even if it is not excluded that the selection mechanism occurs after mucosal crossing, it seems of particular relevance to explore the participation of cell-associated virus present in semen in sexual transmission. The respective contribution of monostratified or pluristratified mucosa in heterosexual transmission is also debated. Indeed, several studies have evidenced an important role of the cervix in this phenomenon [41,42]. In this study, we analysed the transmigration of immune cells across the epithelial monolayer using the well characterized HEC-1A cell line as an epithelial cell model. Indeed, mouse models [18–21] have demonstrated that infected monocytes, applied vaginally, could be rapidly detected in lymph nodes, confirming immune cell transmigration, and that both cell-free and cell associated virus may be infectious in HIV/chimpanzee [43] and in simian immunodeficiency virus/macaque models [22,44]. Although such models are and will stay indispensable for confirming pathophysiological data concerning HIV-1 transmission and tropism selection as well as the testing of topical agents able to prevent

heterosexual transmission of HIV-1, they are relatively inflexible for experiments aimed at documenting the precise mechanisms involved in the mucosal crossing of HIV-1. By contrast, in-vitro permeable cell support culture systems provide convenient ways to address various parameters of HIV-1 mucosal crossing events [45] and could be easily rendered more complex by the addition of vaginal bacterial cells, human seminal plasma, vaginal secretions or chemo-attractant factors.

Monocytes were able to cross the epithelial structure despite the integrity of the monolayer, whereas transmigration of lymphocytes was inefficient, as previously reported [18]. This epithelial crossing may involve specific molecules including CD11a, CD50, ICAM-2 and ICAM-3 [17]. The preferential passage of the R5 strain HIV-1<sub>BaL</sub> associated with monocytes–macrophages is in favour of an important role of the epithelial cell barrier in HIV tropism selection during epithelial crossing, in agreement with the study of Khanna *et al.* [21] using a severe combined immunodeficient mouse model. As previously shown [10,18], our results confirm that cell-free HIV particles are unable to cross the intact





**Fig. 5. Analysis by fluorescent microscopy of peripheral blood mononuclear cell adhesion on human endometrial carcinoma-1A monolayer.** Peripheral blood mononuclear cell (PBMCs; 800 000 cells) were added to the apical compartment of human endometrial carcinoma (HEC)-1A monolayer cultured on filter in the absence (upper picture) or presence (lower picture) of HIV-negative seminal plasma (1/15 dilution in complete DMEM/F12) for 16 h. Filters were washed, fixed by paraformaldehyde solution (3.7% PFA–PBS for 30 min) and incubated with FITC-conjugated anti-CD45 antibodies in the presence of DAPI. Bar = 20  $\mu$ m.

HEC-1A monolayer. Recently, Nazli *et al.* [46] reported that cell-free HIV particles impair the permeability of epithelial cell monolayers taken from intestinal and endometrial explants. In our study, incubation of HEC-1A cells with cell-free particles was not associated with either a significant decrease in TEER and or the detection of HIV particles in the basal compartment. In addition to the fact that the cell models are not strictly equivalent, this discrepancy could be explained by the concentration of HIV particles that was much higher in

another study [46] than in ours. The same authors showed that the treatment of their epithelial polarized structures with exogenous TNF- $\alpha$  was able to decrease TEER significantly. We verified that in our model this cytokine had no effect on the permeability of the monolayer.

Infected monocytes–macrophages cells found in the basal compartment of confluent HEC-1A cell culture inserts were able to transmit HIV infection to activated PBMCs. The tropism of transmitted HIV particles was correlated

to the CCR5-using nature of those found in the basal chamber after monocytes–macrophage cells transmigration. These results were observed with both laboratory-adapted HIV strains and primary isolates exhibiting R5 or dual tropic phenotype.

These data are relevant with respect to in-vivo observations suggesting that immune cells of monocyte origin present in semen are infected with HIV *in vivo* [5] and are able to transmit HIV infection [24,47]. *In vivo*, the putative immune response developed by the host against such foreign leukocytes within the mucosa could favour the recruitment of additional HIV-1 target cells to the epithelium and subsequent viral spread via cell–cell contact.

Human seminal plasma is capable of stimulating an inflammatory response at the female genital site, resulting in a rapid influx of inflammatory cells to the site of contact between semen and female genital mucosa [48]. Endometrial and cervical epithelial cells exposed to semen are capable of secreting a variety of pro-inflammatory cytokines and chemokines, notably IL-6, regulated on activation normal T-cell expressed and secreted, granulocyte macrophage-colony stimulating factor and macrophage chemotactic protein 1 [49], as well as CCL20 [26]. These mechanisms could further facilitate HIV heterosexual mucosal transmission. In light of these observations, we repeated transmigration experiments in the presence of human seminal plasma with the aim of modelling further the complex interactions involved in heterosexual HIV-1 transmission. The use of seminal plasma at the dilution (1/15) was not associated with epithelial cell mortality and was compatible with physiological events during sexual intercourse [30]. We observed a reduction in leukocyte transmigration in the presence of seminal plasma, although a number of monocytes were still able to cross the epithelial structure and, if infected, to transmit the R5 strain HIV-1<sub>BaL</sub>. In addition, seminal plasma was shown to significantly increase the transepithelial resistance of a tight HEC-1A epithelial monolayer, as previously evidenced by Gorodeski and Goldfarb [50] using the CaSki cell line. This effect was maintained over the 18-h period studied, which is therefore relevant with a potential role of semen as a co-factor in HIV transmission and vaginal persistence of the virus [51]. The modification of ZO-1 protein distribution on HEC-1A cells induced by seminal plasma treatment is in agreement with previous data demonstrating the calcium-dependent effect of seminal plasma on TEER and suggesting the potential effect of a semen lipid on epithelial cell membrane fluidity [50]. Moreover, seminal plasma was able to increase the adhesion of both monocytes and lymphocytes to epithelial cells, which could contribute to the diminished number of transmigrating cells in the presence of this fluid. We could not evidence any significant change in adhesion molecule expression

(CD11a for leukocyte and CD54 for epithelial cells) that could explain this observation.

In conclusion, this study brings experimental data sustaining the idea that monocytes, representative of the main immune cell type found in semen, are able to efficiently cross a cellular monolayer, in contrast with lymphocytes. This phenomenon could be, at least in part, responsible for the selective transmission of monocyte-associated HIV particles. In addition, we demonstrate that seminal plasma is able of increasing the capacity of the epithelial monolayer to act as a barrier to cell-associated HIV crossing, while still allowing reduced monocyte transmigration, and could contribute to the negative selection of lymphocytotropic strains during heterosexual transmission. These results are important in understanding the mechanisms involved in the selective crossing of R5 HIV strains through the endocervix monolayer and the complex role of seminal plasma in this process. Our cellular in-vitro model will be helpful to evaluate the role of products used as microbicides for blocking the early phases of genital HIV infection.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Olivier Garraud, Fabrice Cognasse and blood donors at the French regional blood bank EFS Auvergne-Loire for buffy-coat leukocyte concentrates and Michèle Cottier and individuals from the Reproduction Biology Department of the University Hospital of Saint-Etienne for human seminal plasma samples.

P.L., D.P., T.B., B.P. and O.D. conceived and designed the experiments. P.L., D.P., R.T. and O.D. performed the experiments. P.L., D.P., T.B., B.P. and O.D. analysed the data. S.P., T.O. and J.F. contributed to materials/equipment/analysis tools. P.L., O.D. and B.P. wrote the manuscript.

This work was partly supported by a grant from the French Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS). P.L. was funded by a grant from the former Infectiology cluster of Lyon Biopole (now ARC1).

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661–666.



2. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, g protein-coupled receptor. *Science* 1996; **272**:872–877.
3. Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993; **261**:1179–1181.
4. van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, *et al.* Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest* 1994; **94**:2060–2067.
5. Zhu T, Wang N, Carr A, Nam DS, Moor-Jankowski R, Cooper DA, *et al.* Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* 1996; **70**:3098–3107.
6. Schmitt D, Dezutter-Dambuyant C. Epidermal and mucosal dendritic cells and HIV-1 infection. *Pathol Res Pract* 1996; **190**:955–959.
7. Hladik F, Lentz G, Akridge RE, Peterson G, Kelley H, McElroy A, *et al.* Dendritic cell-T-cell interactions support coreceptor-independent human immunodeficiency virus type 1 transmission in the human genital tract. *J Virol* 1999; **73**:5833–5842.
8. Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, *et al.* Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *J Virol* 2002; **76**:9868–9876.
9. Piguet V, Blauvelt A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J Invest Dermatol* 2002; **119**:365–369.
10. Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997; **3**:42–47.
11. Hocini H, Becquart P, Bouhlal H, Chomont N, Ancuta P, Kazatchkine MD, *et al.* Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. *J Virol* 2001; **75**:5370–5374.
12. Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, Van der Schueren B, David G, Kahn B, *et al.* Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol* 2007; **81**:395–405.
13. Berlier W, Bourlet T, Lawrence P, Hamzeh H, Lambert C, Genin C, *et al.* Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J Med Virol* 2005; **77**:465–474.
14. Saidi H, Magri G, Nasreddine N, Réquena M, Bélec L. R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission. *Virology* 2007; **358**:55–68.
15. Mayer KH, Anderson DJ. Heterosexual HIV transmission. *Infect Agents Dis* 1995; **4**:273–284.
16. Tan X, Phillips DM. Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1996; **141**:1177–1189.
17. Carreno M, Chomont N, Kazatchkine MD, Irinopoulou T, Krief C, Mohamed AS, *et al.* Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells. *J Virol* 2002; **76**:32–40.
18. Chancey CJ, Khanna KV, Seegers JFML, Zhang GW, Hildreth J, Langan A, *et al.* Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (SCFV) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. *J Immunol* 2006; **176**:5627–5636.
19. Iбата B, Parr EL, King NJ, Parr MB. Migration of foreign lymphocytes from the mouse vagina into the cervicovaginal mucosa and to the iliac lymph nodes. *Biol Reprod* 1997; **56**:537–543.
20. Di Fabio S, Giannini G, Lapenta C, Spada M, Binelli A, Germignano E, *et al.* Vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice: a new model for the evaluation of vaginal microbicides. *AIDS* 2001; **15**:2231–2238.
21. Khanna KV, Whaley KJ, Zeitlin L, Moench TR, Mehrhaz K, Cone RA, *et al.* Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *J Clin Invest* 2002; **109**:205–211.
22. Sallé B, Brochard P, Bourry O, Manniaoui A, Andrieu T, Prévot S, *et al.* Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2010; **202**:333–336.
23. Politch JA, Mayer KH, Anderson DJ. Depletion of CD4+ T cells in semen during HIV infection and their restoration following antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **50**:283–289.
24. Anderson DJ, Yunis EJ. Trojan horse? leukocytes in aids. *N Engl J Med* 1983; **309**:984–985.
25. Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, *et al.* A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 2002; **54**:33–42.
26. Berlier W, Cremel M, Hamzeh H, Lévy R, Lucht F, Bourlet T, *et al.* Seminal plasma promotes the attraction of langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum Reprod* 2006; **21**:1135–1142.
27. Bouhlal H, Galon J, Kazatchkine MD, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Haefliger Cavaillon N. Soluble CD16 inhibits cr3 (CD11b/CD18)-mediated infection of monocytes/macrophages by opsonized primary R5 HIV-1. *J Immunol* 2001; **166**:3377–3383.
28. Münch J, Rücker E, Ständker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, *et al.* Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 2007; **131**:1059–1071.
29. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod* 2007; **22**:2928–2935.
30. Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 2007; **13**:491–501.
31. Ongradi J, Ceccherini-Nelli L, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Acid sensitivity of cell-free and cell-associated HIV-1: clinical implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; **6**:1433–1436.
32. Deléazay O, Yahi N, Tamalet C, Baghdigian S, Boudier JA, Fantini J. Direct effect of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) on intestinal epithelial cell differentiation: relationship to HIV-1 enteropathy. *Virology* 1997; **238**:231–242.
33. Labrosse B, Brelot A, Heveker N, Sol N, Schols D, De Clercq E, *et al.* Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J Virol* 1998; **72**:6381–6388.
34. Repnik U, Knezevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J Immunol Methods* 2003; **278**:283–292.
35. O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 2002; **76**:10942–10950.
36. Lawrence P, Berlier W, Delezay O, Palles S, Olivier T, Saoudin H, *et al.* Construction and tropism characterisation of recombinant viruses exhibiting HIV-1 env gene from seminal strains. *Virology* 2009; **386**:373–379.
37. Troupin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, Brelot A, Heveker N, *et al.* Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* 2001; **75**:251–259.
38. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophoton Int* 2004; **11**:36–42.
39. Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993; **67**:3345–3356.
40. Margolis L, Shattock R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**:312–317.
41. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietrefe S, Staskus KA, Reimann KA, *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+T cells. *Science* 1999; **286**:1353–1357.
42. Li Q, Estes JD, Schlievert PM, Duan L, Brosnahan AJ, Southern PJ, *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* 2009; **458**:1034–1038.



43. Fultz PN, McClure HM, Daugharty H, Brodie A, McGrath CR, Swenson B, *et al.* **Vaginal transmission of human immunodeficiency virus (HIV) to a chimpanzee.** *J Infect Dis* 1986; **154**:896–900.
44. Kaizu M, Weiler AM, Weisgrau KL, Vielhuber KA, May G, Piaskowski SM, *et al.* **Repeated intravaginal inoculation with cell-associated simian immunodeficiency virus results in persistent infection of nonhuman primates.** *J Infect Dis* 2006; **194**:912–916.
45. Van Herreweghe Y, Michiels J, Waeytens A, De Boeck G, Salden E, Heyndrickx L, *et al.* **A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides.** *Antiviral Res* 2007; **74**:111–124.
46. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, *et al.* **Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation.** *PLoS Pathog* 2010; **6**:e1000852.
47. Levy JA. **The transmission of aids: the case of the infected cell.** *JAMA* 1988; **259**:3037–3038.
48. Thompson LA, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. **The leukocytic reaction of the human uterine cervix.** *Am J Reprod Immunol* 1992; **28**:85–89.
49. Robertson SA, Mau VJ, Tremellen KP, Seamark RF. **Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice.** *J Reprod Fertil* 1996; **107**:265–277.
50. Gorodeski GI, Goldfarb J. **Seminal fluid factor increases the resistance of the tight junctional complex of cultured human cervical epithelium CaSki cells.** *Fertil Steril* 1998; **69**:309–317.
51. Tevi-Bénissan C, Bélec L, Lévy M, Schneider-Fauveau V, Si Mohamed A, Hallouin MC, *et al.* **In vivo semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; **4**:367–374.

### III. Synthèse

Dans ce premier article nous avons étudié la transmigration de cellules immunitaires infectées par HIV à travers un modèle *in vitro* de muqueuse génitale endocervicale reconstruite à partir d'une lignée de cellules HEC-1A. Ce modèle muqueux, facilement modifiable et simple à complexifier par l'ajout de cellules immunitaires et de bactéries, ainsi qu'en modulant l'environnement cytokinique de la muqueuse, ou par addition de plasma séminal, est intéressant pour l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme.

Nous montrons dans cette étude que les monocytes/macrophages sont capables de traverser spécifiquement une muqueuse endocervicale parfaitement étanche. Le virus associé aux monocytes/macrophages ayant transmigré peut être transmis à des cellules immunitaires activées (PBMC), placées au niveau basal. Il montre un tropisme R5, ce qui est cohérent avec le tropisme du virus infectant les monocytes/macrophages. En revanche, la transmigration des lymphocytes à travers la muqueuse endocervicale est inefficace. La présence de plasma séminal diminue la capacité de transmigration des monocytes/macrophages. Nous montrons que le plasma séminal augmente la résistance *trans*-épithéliale de la monocouche endocervicale par l'augmentation de l'expression de la protéine de jonction ZO-1 et donc le renforcement des jonctions cellulaires, ce qui explique la transmigration moins efficace des cellules immunitaires à travers la muqueuse.

Ainsi, les résultats obtenus nous montrent que les monocytes/macrophages, qui constituent les cellules immunitaires majoritaires dans le sperme et qui sont principalement infectables par des virus à tropisme R5, sont capables de transmigrer efficacement à travers la muqueuse endocervicale et de transmettre le virus infectieux à des cellules immunitaires sous-muqueuses. Ce phénomène semble être impliqué dans la sélection à tropisme R5 observée lors de la transmission hétérosexuelle de HIV. De plus, nous avons démontré que le plasma séminal augmente la résistance *trans*-épithéliale de la muqueuse endocervicale, renforçant ainsi son rôle de barrière contre le passage du virus associé aux cellules. Malgré cela, les monocytes/macrophages infectés peuvent traverser efficacement la barrière muqueuse, alors que les lymphocytes n'en sont pas capables. Ces observations suggèrent que la muqueuse endocervicale et le plasma séminal interviennent dans la sélection négative de la transmission de souches à tropisme X4 infectant principalement les lymphocytes.

## Article II: Direct Visualization of X4 and R5 replicative fluorescent HIV-1 viruses in human endocervical cells

Rachel Terrasse<sup>1</sup>, Yacine Hadjali<sup>2\*</sup>, Sabine Palle<sup>3\*</sup>, Leo Heyndrickx<sup>4</sup>, Olivier Delezay<sup>1</sup>, Thomas Olivier<sup>3</sup>, Yann Gavet<sup>2</sup>, Guido Vanham<sup>4</sup>, Jean-Charles Pinoli<sup>2</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1</sup>, Thomas Bourlet<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP-EA 3064), PRES de Lyon, Université Jean Monnet, IFRESIS et CHU de Saint-Etienne ; <sup>2</sup>Centre Ingénierie et Santé, Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint-Etienne, France ; <sup>3</sup>Centre de Microscopie Confocale Multi photonique, PRES de Lyon, Université Jean Monnet, Pôle Optique et Vision, Saint-Etienne ; <sup>4</sup>Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique.

*Soumis à publication.*

### **I. But de l'étude**

Lors de la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme, divers mécanismes de franchissement du virus libre ou associé aux cellules à travers la muqueuse génitale féminine peuvent intervenir, tel que la transmigration, l'infection de cellules épithéliales ou immunitaires sous-muqueuses ainsi que la transcytose, mais leur importance dans un contexte physiopathologique n'est pas encore clairement élucidée [15,167,191]. Dans l'article précédent nous avons montré, à partir d'un modèle *in vitro* de muqueuse endocervicale reconstruite, que les virus associés aux cellules, principalement ceux à tropisme R5 associés aux monocytes/macrophages, sont capables de trans migrer à travers la muqueuse endocervicale, jouant ainsi un rôle important dans la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme et la sélection des souches à tropisme R5 [259]. Il a également été démontré que le virus libre peut traverser la muqueuse génitale féminine par transcytose à travers les cellules épithéliales génitales féminines, sans induire d'infection [96,196]. Les mécanismes de la transcytose, ainsi que sa pertinence *in vivo* sont encore mal connus et assez controversés. Les nombreux acteurs impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV (plasma

séminal, NSMC, cellules épithéliales, cellules immunitaires de l'hôte, etc.) ainsi que la complexité et la diversité des interactions virus-cellules rendent l'étude des mécanismes de transmission de HIV par voie sexuelle difficile et nécessite, de plus, le développement et l'utilisation de techniques de visualisation pertinentes.

Divers moyens de visualisation de l'infection des cellules par HIV ont été développés, mais ils sont peu adaptés à l'étude de la transmission hétérosexuelle. En effet, les principaux outils virologiques fluorescents actuellement disponibles sont des pseudovirus « one-shot », exprimant une protéine de fusion fluorescente détectable sur un unique cycle de réplication du virus, ne permettant donc pas de visualiser le devenir du virus après avoir pénétré dans une cellule [251,253]. La nécessité d'utiliser des virus recombinants fluorescents réplicatifs et infectieux, détectables sur plusieurs cycles de réplication, a incité le développement de virus chimériques répondants à ces critères [54,233]. Pourtant, les virus chimériques n'ont été, jusqu'à présent que peu, voire pas, utilisés dans l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV à travers la muqueuse génitale féminine [54,233,238,260].

Dans cette étude nous avons adapté et utilisé un virus chimérique fluorescent, réplicatif et infectieux sur plusieurs cycles de réplication, initialement développé par l'équipe de F. Kirchhoff [54]. Nous avons ainsi pu visualiser par microscopie confocale le passage de virus libres à tropisme X4 ou R5 à travers un modèle *in vitro* de muqueuse endocervicale. Dans le but de standardiser la détection des différents éléments d'intérêt, nous avons développé, en collaboration avec l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, une technique de segmentation et d'analyse des signaux fluorescents, à l'aide d'un modèle mathématique.

## **II. Article soumis à publication**

## Direct Visualization of X4 and R5 replicative fluorescent HIV-1 viruses in human endocervical cells

Rachel TERRASSE<sup>1</sup>, Yacine HADJALI<sup>2\*</sup>, Sabine PALLE<sup>3\*</sup>, Leo HEYNDRICKX<sup>4</sup>, Olivier DELEZAY<sup>1</sup>, Thomas OLIVIER<sup>3</sup>, Yann GAVET<sup>2</sup>, Guido VANHAM<sup>4,5</sup>, Jean-Charles PINOLI<sup>2</sup>, Bruno POZZETTO<sup>1</sup>, Thomas BOURLET<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, PRES de Lyon, Université Jean Monnet, IFRESIS et CHU de Saint-Etienne, France.

<sup>2</sup> École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, LPMG-CNRS FRE 3312, 158 cours Fauriel, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France.

<sup>3</sup> Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique, Université Jean Monnet, Pôle Optique et Vision, Bâtiment F, 18 rue Professeur Benoît Lauras, 42000 Saint-Etienne, France.

<sup>4</sup> Virology Unit, Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

<sup>5</sup> Faculty of Biomedical, Pharmaceutical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium.

### Abstract:

Worldwide most HIV infections occur through heterosexual transmission, involving complex phenomena including interactions between cell-free and cell-associated particles with the female genital tract mucosa. The underlying mechanisms remain poorly understood. Therefore we standardized an *in vitro* model combining the visualization of virus and cell contacts with signal's quantification by using mathematical approaches. We first developed X4- and R5-tropic replicative-competent eGFP/dsRedExpress expressing chimeric constructs. Endometrial HEC1-A cells were infected by these constructs for various times. Our constructs were directly visualized using confocal microscopy. Intracellular fluorescent particles were also quantified by using a mathematical model. Additionally, free-particles transmission from HEC1-A to immune-competent cells was demonstrated. Combined with molecular biology, the data suggest that epithelial cells do not support a complete viral replication cycle, and that R5-tropic strains are preferentially transmitted. This model is useful to study early phenomena of heterosexual transmission and evaluate the ability of various compounds to block HIV transmission.

\* Both authors participate equally to the work

### Introduction

Heterosexual transmission of HIV by semen from infected men to the genital mucosa of uninfected women is the main cause of new infections worldwide. This mode of transmission implies the contact of semen from infected men with genital mucosa of uninfected woman [1]. HIV is present in semen as cell-associated virus in non-spermatozoa mono-nuclear cells (NSMC) as well as cell-free particles. Diverse routes of transmission through the mono- and pluri-stratified female genital mucosa have been described, involving these two forms of viruses [2–6]. One model suggests that cell-free particles pass through the epithelial cells by transcytosis [5,7]. Another suggested route of transmission is the transmigration of seminal mononuclear cell-associated viruses through the female genital tract [8,9]. However, many questions on the exact transmission mechanisms remain debated; especially the respective role of mono- or multi-layered epithelium and the form of virus being transmitted remain a matter of debate. In the era of new prevention strategies with variable success rates, including Pre-Exposure Prophylaxis (PreP), microbicides and treatment as prevention (TasP) and HIV cure strategies, understanding these mechanisms is of prior importance in order to further develop better strategies of prevention methods - including microbicides, vaccines and antiretroviral drug-therapy.



In order to visualize virus-cells interactions, several authors have developed different kinds of virological tools, such as luminescent one-shot pseudoviruses, replication competent fluorescent viruses and directly-tagged viral particles [10–15]. On the other hand, various *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models have been described to study mucosal HIV transmission. Although *in vivo* models are undoubtedly the most relevant, they are too expensive and time-consuming for larger numbers of experiments. *Ex vivo* models based on cervicovaginal explants respect tissue architecture and its physiological and immunological characteristics, but are poorly reproducible and may present an enhanced inflammatory environment [16,17]. *In vitro* models are constituted of various cell lines including normal human epithelial cells and continuous cell lines [5,7,17–19]. Even though they do not entirely present human physiological characteristics; these models have the advantage of being highly reproducible and they enable the in depth study of interactions between virus and genital epithelial cells, especially by confocal microscopy.

We describe herein an *in vitro* model dedicated to the visualization of virus and epithelial cells interactions. To this end, fluorescent infectious and replicative-competent R5- and X4-tropic chimeric viruses were constructed and used for HEC1-A cells infection experiments. The presence of chimeric viruses in the cells was visualized by confocal microscopy and a standardized localization and quantification of infected cells was determined by using appropriate mathematical models based on watershed algorithm [20].

## Material and methods

### *Cellular and virological tools*

#### Cells

The human endometrial cell line HEC-1A was cultured in McCoy's medium (PAA, Les Mureaux, France) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS, Hyclone) and 1% of antibiotic/anti-mycotic solution (PAA). Three days prior infection, cells were seeded at  $1 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates on cover glasses (22x22mm #1.5, Menzel-Gläser) or  $1 \times 10^5$  cells/well in 12-well plates 4 days prior infection and maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

Epithelial cell surface expression of CD4, CXCR4 and CCR5 molecules was evaluated by flow cytometry analysis (FACS Calibur cytometer, BD biosciences, Le Pont de Claix, France) as previously described [21].

HEK-293 cell line was cultured in DMEM- High Glucose medium (PAA) supplemented with 10% of FBS, 1% of antibiotic/anti-mycotic solution and 1% of non-essential amino acids (PAA). Cells were seeded in 6 well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well), 48 hours prior to transfection experiments and cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

TZM-bl cells were cultured in DMEM- High Glucose medium supplemented with 10% of FBS and 1% of antibiotic/anti-mycotic solution. Cells were seeded in a 96-wells plates ( $2 \times 10^4$  cells/well), 24 hours prior to viral infection and cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained and separated from buffy coats of healthy donors, by gradient density assay using Lymphoprep™ (Abcys, Paris, France) and cultured in RPMI 1640 medium (PAA) supplemented with 10% of FBS and 1% of antibiotic/anti-mycotic solution and activated 2 to 3 days before virus infection by addition of 10µg/ml of

phytohaemagglutinin (PHA) and 10 ng/ml of interleukin-2 (IL-2) during 30 min and then 2 µg/ml of PHA for 2 to 3 days.

#### HIV-1 strains

The HIV-1 BaL (CCR5-tropic virus) and HIV-1 HXB2 (CXCR4-tropic) laboratory strains (NIH AID Research & Reference Reagent Program) were used to construct chimeric viruses.

The HIV-1 Lai (CXCR4-tropic virus) strain, HIV-1 BaL and two primary isolates, 92UG029 (CXCR4-tropic) and 92US660 (CCR5-tropic) -obtained from NIH AID Research & Reference Reagent Program- were used in HEC1-A infection experiments. Cell-free virus was produced after 10 days of infection of IL-2/PHA stimulated PBMC. Virus titration was done by p24 ELISA.

#### Quantification of p24 antigen by ELISA

The quantification of p24 antigen was done on supernatants of transfection experiments (chimeric viruses) by an “in-house” ELISA assay, as previously described [22]. The threshold of sensitivity of the test was approximately 100 pg/ml. Samples that scored negative in the “in-house” ELISA were tested in a more sensitive ELISA from ABL (Rockville USA) with a threshold of 3.1 pg/ml. Optical densities were measured at 450 nm.

#### Amplification and quantification of total proviral HIV DNA and viral RNA

Epithelial cells were trypsinized, pelleted by centrifugation for 10 min at 430 x g and washed prior to DNA or RNA extraction process. Total DNA and RNA were then extracted from 10<sup>6</sup> cells batches by using the QIAamp DNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) respectively, according to manufacturer’s instructions.

The HIV proviral DNA was quantified by real time PCR according to the protocol described by Friedrich et al. [23]. Briefly, a HIV LTR genomic fragment was amplified by the iTaq Fast Supermix (BioRad, France) supplemented by the forward LTR1 (5'-GCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A-3') and the reverse LTR2 (5'-TCC ACA CTG ACT AAA AGG GTC TGA-3') primers and the LTR molecular ProHIV probe (5'-FAM-GCG AGT GCC CGT CTG TTG TGT GAC TCT GGT AAC TAG CTC GC-DABCYL-3'). The amplification was performed using an ABI 7500<sup>®</sup> apparatus (Applied Biosystem, France) and the quantity were determined by reference to a standard curve based on serial dilutions of 8E5 cells (containing one HIV DNA copy per cell). Results are expressed as number of DNA copies/10<sup>6</sup> cells.

Extra- and intracellular HIV RNA was quantified by the Generic HIV Viral load assay (Biocentric, Bandal, France), using the ABI 7500<sup>®</sup> apparatus. Results are expressed as number of copies/ml.

#### Confocal microscopy

The samples were analyzed with a Leica TCS-SP2 confocal scanning laser inverted microscope (Leica-Microsystem, Heidelberg, Germany). The fluorescent markers were excited with a set of three continuous wave lasers delivering monochromatic light at wavelength equal to 488 nm (for eGFP excitation), 543 nm (for both Alexa Fluor 555 and DsRedExpress excitation) and 633 nm (for Alexa Fluor 647 excitation). An oil immersion objective (HCX PL APO 63X 1.4NA) was used in all experiments. Image stacks were further analyzed and processed using ImageJ software [24] to perform average projection of stacks, contrast enhancement and merging of the DIC and fluorescence channels.

### *Chimeric viruses*

#### Construction

Fluorescently tagged (eGFP/dsRedExpress) chimeric viral constructs harboring the envelope of HIV-1 HXB2 (X4-tropic) or BaL (R5-tropic) were used to produce replication competent chimeric viruses as previously described [25,26]. Briefly, 1 µg of plasmid DNA was used to transfect HEK293, or HEK293T cells cultured in 6-well plates, by using FUGENE 6 Transfection Reagent (Promega). Forty eight hours post transfection, 3 ml of supernatant were collected, Foetal Bovine Serum (FBS) was added to a final concentration of 10% and clarified by filtration (0.45 µm). The filtrates were aliquoted and stored at -80°C until needed (p24 ELISA assay and infectiousness test on TZM-bl reporter cells).

#### Titration of chimeric viruses

Titration of the chimeric viruses was done in TZM-bl cells, permissive for both R5- and X4-tropic viruses as previously described [27].

TZM-bl target allow detection of HIV infection *via* the Tat-induced expression of two reporter genes, Luciferase and β-galactosidase respectively. The level of infection was determined by measuring luminescence activity (TriStar LB941, Berthold Technologies) using non-infected cells as a negative control and a laboratory virus (HIV-1 Lai) as well as a primary isolate (SF162) as positive controls. In practice, TZM-bl cells were incubated with 50 µL of culture supernatant containing the chimeric virus and with 20 ng/ml DEAE-Dextran (Sigma) for 48 h. Luciferase substrate (Bright-Glo™ Luciferase Assay System, Promega, France) was then added to the cells for 5 min before measurement of luminescence. The luminescence signal was acquired during 5 second for each well after a brief shake of the plate, using the TriStar LB941 (Berthold Technologies). Results are expressed in RLU (Relative Luminescence Unit). Four to seven transfections were done for each plasmids; each titration in TZM-bl was done in duplicate.

#### Characterization by confocal microscopy

In order to check the ability of the eGFP/dsRedExpress expressing viruses to be visualized in confocal microscopy, cell-free particles were seeded on glass cover-slips in 6-well plates for 3 h. After a washing step cover-slips, containing free viral particles were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)-PBS for 2 h and incubated for 10 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl to quench free aldehydes. Afterwards, slides were incubated in 0.1% Triton X-100-PBS for 20 min and next 20 µg/ml of the primary HIV-1 Gag p24 Goat polyclonal antibody (LSBIO, Seattle, USA) in PBS with 10% was added for 1 h. After several washing steps, slides were finally incubated with 2.7 µg/ml of the secondary Alexa Fluor 647 Donkey anti-goat antibody (Invitrogen) for 2 h in PBS with 10% FBS. Coverslips were mounted using Fluoprep mounting medium (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) before visualization by confocal microscopy.

In order to check the visualization of intracellular viral particles, PHA-activated PBMC were incubated for 24 h with chimeric viruses (200 pg/mL of p24 added to 5 x 10<sup>6</sup> cells). Cells were then washed, fixed using 4% PFA-PBS for 2 h and then incubated for 10 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl to quench free aldehydes. Infected cells were incubated with a mouse anti-human CD26 antibody (Santa Cruz Biotechnology) in PBS with 10% FBS overnight at 4°C in the dark. After several washing steps, cells were then incubated with relevant secondary antibodies, depending on the fluorochrome expressed by the chimeric virus used: Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (green), in combination with pBrNL4.3-dsRedExpress (red) or Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (H+L) antibodies (red) in combination with pBrNL4.3-eGFP (green) (Invitrogen, Oregon, USA) for 2 h in PBS with 10% FBS.



Coverslips were mounted using Fluoprep mounting medium (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) before visualization by confocal microscopy.

#### *Infection of HEC-1A cells by X4- and R5-tropics HIV-1 strains*

##### Visualization by confocal microscopy

Cells were seeded on glass cover-slips in 6-well plates for 3 days before incubation with chimeric viruses during various times (3 h, 5 h, 8 h, 15 h and 24 h). Cells were washed and fixed in 4% PFA-PBS for 2 h to 6 h and then incubated for 10 min in 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to quench free aldehydes. After an incubation step of 20 min in 0.1% Triton X-100-PBS, cells were incubated overnight at 4°C in the dark with relevant antibodies, mouse anti-human ZO-1 (BD Biosciences) and/or HIV-1 gag p24 Goat polyclonal antibody (LSBIO), diluted in PBS with 10% FBS. Following washing steps, cells were incubated with relevant secondary antibodies, Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L), in combination with pBrNL4.3-dsRedExpress chimeric viruses or Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (H+L) antibodies in combination with pBrNL4.3-eGFP chimeric viruses (Invitrogen, Oregon, USA) or Alexa Fluor 647 Donkey anti-goat antibody (Invitrogen) for 2 h in PBS with 10% FBS and mounted using Fluoprep mounting medium (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Three infection experiment were done per construct.

##### Quantitative image analysis

In order to standardize the analysis of the digital images obtained by confocal optical microscopy, we have developed specific methods based on image processing and analysis techniques. These methods include: image denoising, cells and nuclei segmentation (spatial detection), localization of viruses and detection of infected cells. The segmentation methods presented here mainly come from the field of mathematical morphology. The reader can refer to [28,29] to get a detailed description. To segment the nuclei, a specific image processing and analysis method has been applied.

First, a so-called alternate sequential morphological filter is applied to the image of nuclei. Second, the filtered image is thresholded (i.e., binarized) in order to get a bi-level (i.e., binary) image in which the nuclei appear in white (1-level). Third, a distance map is computed on the binary image in order to get the local minima that will serve as computing markers. Fourth, those markers act as seeds to a constrained watershed algorithm applied on the inverse of the distance map. The watershed algorithm can be defined as follow: the distance map can be seen as a topographic relief and intuitively, a drop of water falling on a topographic relief flows towards the "nearest" local minimum. Hence, the union of spatial locations where the water can fall on strictly more than two local minima builds the so-called watershed lines. These lines optimally separate the nuclei from a morphological viewpoint.

To segment the cell contours another specific image processing and analysis method has been next applied. First, it also starts with an alternate sequential morphological filter, followed by the residue computation (difference between the original image and the filtered image). Second, to preserve the straight parts of the contours, a union of the morphological openings is performed, and third the morphological skeleton is computed. Finally, the skeleton can be pruned to eliminate over-segmented contours, by the use of distance map and watershed constrained by its maxima. The theoretical and applied background of the complete image processing and analysis methods are detailed in [20] in the case of the corneal endothelium cells segmentation.

Finally, the virus is quantified in terms of spatial fraction by using a local mean filter followed by an intensity thresholding.

#### Analysis of infection by real-time PCR

HEC-1A cells were cultured in 12-wells plates as described above. When a cell confluence of 80% was obtained, cells were incubated for 24 h with HIV-1 strains (200 pg of Lai, Bal, 92US660 or 92US029). The presence of intracellular particles and reverse transcription activity was evaluated by quantifying HIV RNA and proviral DNA using real-time PCR assays [23]. The use of CXCR4 and CCR5 co-receptors for HIV entry was verified by incubating the cells with 100 ng/ml of rhSDF-1 $\alpha$  (CXCL12) or rhRANTES (Peprotech, USA) 2 hours before adding CXCR4- or CCR5-tropic strains in cell culture medium. The effect of azidothymidine (10  $\mu$ mol/L, GSK) on HIV reverse transcription was studied under the same conditions.

In some experiments, cells infected with HIV for 24 h were incubated with proinflammatory cytokines rhTNF- $\alpha$  (10 ng/ml) and rhIL-1 $\beta$  (25 ng/ml) (Peprotech, USA) for an additional 24 h, before quantifying intracellular and extracellular HIV RNA and DNA as well as p24 production in cell supernatant.

#### Transmission experiments

HEC-1A cells were cultured in semi-permeable inserts with 0.3  $\mu$ m pores (24-wells per plate) until a tight monolayer was obtained (controlled by Trans-Epithelial Electrical Resistance values of 450-600 ohm). Cells were then incubated with chimeric viruses (pBrNL4.3-HXB2-dsRedExpress and/or pBrNL4.3-Bal-eGFP) at 200 pg of p24 per ml for 24 h. After 3 washing with PBS 1X, inserts containing infected HEC-1A were deposited in wells containing activated PBMC in order to obtain cell to cell contacts (15x10<sup>6</sup> PBMC per well) and incubated for 24 h. Potentially infected PBMC were then washed, fixed and stained as described above.

### **Results**

#### *Chimeric virus construction*

Chimeric vectors obtained according to Van den Bergh et al<sup>26</sup> paper were transfected in HEK293 or HEK293T cells. The production of chimeric viruses was quantified by p24 ELISA (Figure 1 D). Mean values of 256 (+/- 91), 180 (+/- 40), 325 (+/- 64) and 44 (+/- 6) pg/ml were obtained for pBrNL4.3-HXB2-eGFP, pBrNL4.3-HXB2-dsRedExpress, pBrNL4.3-Bal-eGFP and pBrNL4.3-Bal-dsRedExpress chimeric viruses, respectively.

Viruses were then tested for their infectiousness using TZM-bl reporter cells. The luciferase activity of infected TZM-bl cells was measured using a Tri Star LB941, Berthold Technologies apparatus. Median [min-max] relative light units (RLU) values of 1.38 x 10<sup>5</sup> [3.1 x 10<sup>4</sup> - 2.2 x 10<sup>6</sup>]; 2.7 x 10<sup>5</sup> [2.2 x 10<sup>4</sup> - 5.9 x 10<sup>6</sup>]; 2.0 x 10<sup>5</sup> [2.0 x 10<sup>5</sup> - 4.2 x 10<sup>5</sup>]; 2.4 x 10<sup>4</sup> [4.7 x 10<sup>3</sup> - 8.5 x 10<sup>4</sup>] were obtained for pBrNL4.3-HXB2-eGFP, pBrNL4.3-HXB2-dsRedExpress, pBrNL4.3-Bal-eGFP and pBrNL4.3-Bal-dsRedExpress chimeric viruses respectively.

In order to use the most infectious chimeric viruses, we arbitrarily chose to retain only those exhibiting RLU values > 10<sup>5</sup> and similar p24 values for further experiments. For this reason the pBrNL4.3-Bal-dsRedExpress chimeric virus was not used.

The ability of the dsRedExpress and eGFP fluorochromes expressed by chimeric viruses to be visualized by confocal microscopy was then controlled. For this, free particles were seeded on glass cover-slips and labeled by anti-p24 antibodies and AF 647 conjugate. As shown in Figure 2 A-C, the

p24 staining co-localized with the fluorescence signals expressed by eGFP and dsrRedExpress of chimeric viruses.

In addition, the ability of cell-associated chimeric viruses to be visualized in infected PBMC was done. As shown on Figure 2 (D-F) both eGFP and dsRedExpress signals were detected from cell-associated chimeric viruses.

These results validate the chimeric viruses' replicative capacity and their ability to be directly visualized by confocal microscopy.

#### *Visualization of HEC-1A kinetic of infection by X4- or R5-tropic chimeric viruses*

In order to visualize the presence of free particles in HEC-1A cells, chimeric viruses exhibiting an X4- (pBrNL4.3-HXB2-eGFP) or R5- (pBrNL4.3-BaL-eGFP) tropism were incubated with cells during various times (3, 5, 8, 15 and 24 h). The presence of X4- or R5-tropic viruses into HEC-1A cells was revealed by confocal microscopy (Figure 3). Interestingly, the localization of X4-tropic strains appears to be mainly in the nucleus of cells starting from 8h of contact (Figure 3 C-D/8 h, 15 h and 24 h), whilst R5-tropic strains exhibit a cytoplasmic location until 24 h of contact (Figure 3 A-B/24 h).

#### *Quantitative image analysis of HEC-1A infection by X4- and R5- tropic HIV-1 chimeric viruses*

In order to standardize the analysis of the pictures obtained by confocal microscopy, we have developed a set of strategies based on image processing acquired to confocal microscopy imaging. These strategies include: image denoising, cells segmentation, detection of infected cells. The image denoising improves the visual quality of images; this step is achieved by applying a set of filters based on mathematical morphology. Then, the cells boundaries are extracted by using watershed algorithm as previously described [20]. Finally, these strategies are used to quantify the virus in the cells. To this end, we specifically selected positive areas for the presence of chimeric viruses into epithelial cells. Segmented pictures from HEC-1A cells infected for 3 h, 15 h and 24 h are shown on Figure 4 A. Each picture is representative of the global analysis, corresponding to the investigation of at least 6 series and 80 to 150 z stacks per condition. On Figure 4 B, are mentioned the respective proportions of infected cells at each time of infection (3 h, 15 h and 24 h), and based on a range of 154 to 569 cells.

From 3 h to 24 h of contact, our data show an increased percentage of infected cells from 21 to 53% and from 35 to 43% for R5- and X4- strains respectively.

#### *Confirmation of infection by HIV-1 nucleic acid quantification*

To verify that signals observed by confocal microscopy correspond to intracellular location of chimeric viruses, we amplified HIV RNA and/or DNA from infected HEC-1A by quantitative real-time PCR assay. A similar amount of intracellular HIV RNA for X4- and R5-tropic viruses was found after 24h of infection ( $9 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  copies/ml respectively). X4-tropic viruses used CXCR4 co-receptor to enter the cells, since no HIV RNA was detected in experiments using rhSDF-1 $\alpha$  treated HEC1-A (data not shown).

At the opposite, R5-tropic viruses seemed not to enter into endocervical cells by using CCR5 co-receptor since the incubation of cells with rhRANTES, the natural ligand of CCR5, did not inhibit the entry of viruses (data not shown). It is known that HEC-1A cells do not express CCR5 co-receptor, but it is not clear how BaL has entered the cells.

Moreover, HIV proviral DNA was also detected in cells infected by the primary X4 virus 92UG029 but not by R5-tropic virus 92UG660, whilst both viruses entered the cells (Figure 5). The incubation of



cells with AZT prevented the production of proviral DNA, suggesting that the genome of X4-tropic virus was reverse-transcribed and could penetrate into the nucleus of HEC-1A. Nevertheless, no production of new viral particles was observed in these cells, by measuring the quantity of p24 viral proteins in the supernatant of infected HEC-1A cells, 24 h and 48 h post infection (data not shown). To check the ability of proviral DNA to be activated, pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were added to infected-cells. No changes were observed in terms of intracellular proviral DNA concentration, intracellular HIV RNA and quantity of p24 viral proteins in the supernatant of infected cells (Figure 5).

#### *Transmission experiments*

In order to visualize the ability of epithelial cells to transmit viral particles to immune permissive cells, HEC1-A cultured on inserts (upper chamber) were infected with either X4- or R5-tropic or both chimeric viruses (Figure 6 A-C). After 3 washing steps of HEC-1A at the basal and apical side, inserts were deposited in wells containing activated PBMC, in order to obtain cell to cell contacts at the basal side. No dsRedExpress signal was detected by confocal microscopy in PBMC after contact with HEC-1A cells infected by X4-tropic viruses (Figure 6 A). A positive signal was detected in PBMC after contact with HEC1-A cells infected by R5-tropic dsredExpress strains (Figure 6 B). When HEC1-A cells were concomitantly infected by both X4- and R5-tropic strains, a strong signal is observed for R5 whereas only a weak signal is detected for X4 virus in PBMC (Figure 6 C).

#### **Discussion**

In the present work, we used X4- and R5-tropic replicative-competent eGFP/dsRedExpress expressing chimeric constructs. In some previous studies, viruses visualization experiments were done by using fluorescent antibodies directed against viral components such as p24 [6]. In others, constructs tagged by various fluorescent markers have been developed in order to visualize HIV and cell interactions, and to characterize HIV permissive cells or intra-cellular trafficking of viral components. For example, a fluorescent virus carrying eGFP at the C terminus of the matrix domain of Gag was used to assess specifically the localization and trafficking of Gag towards polysynapses in living T cells [14]. According to the authors, the infectivity of this construct was reduced. Infectious and noninfectious GFP-Gag tagged viral particles were also constructed to establish the role of intestinal DCs in the transportation of HIV-1 particles through the intestinal mucosa and their subsequent transmission to T cells [13]. Similar constructs were used in experiments demonstrating that macrophages in vagina are permissive to HIV-1 [13]: in this study, eGFP was not directly detected but an anti-GFP antibody was used to visualize fluorescent signals, increasing the risk of false-positive signals. Studies dealing with the localization of viral particles in cells and their ability to cross the mucosal barrier are rare. Campbell et al [12] have generated virions dually labeled with S15-mCherry and GFP-Vpr. The loss of the S15-mCherry membrane signal was observed following fusion with the cell membrane, but also the signal of GFP-Vpr, 4h after cell infection. In our work, we used an infectious, replication competent and fluorescent chimeric virus, that was initially developed to study the role of *nef* in enhancing viral infectivity [30] and the role of visfatin against R5 replication [26]. We have demonstrated that these constructs are useful to obtain a long-term signal of particles post-infection and can be used to standardize the HIV-1 *in vitro* mucosal transmission. These chimeric constructs

expressing dsRed or eGFP proteins can be used either with a R5- or an X4-tropic envelop, and either as cell-free or cell-associated viruses. The fluorescent markers were directly detected by confocal microscopy and distinguished from cellular components such as ZO-1 or CD26 visualized by using Alexa antibodies.

In order to standardize the analysis of the pictures obtained by confocal microscopy, we have developed strategies based on image processing acquired to confocal microscopy imaging. These strategies include: image denoising, cells segmentation, detection of infected cells. The image denoising improves the visual quality of images; this step is achieved by applying a set of filters based on mathematical morphology. Then, the cells boundaries are extracted by using watershed algorithm as previously described [20]. These strategies were used to quantify the virus in the cells in terms of spatial fraction by using a local mean filter followed by an intensity thresholding. As we have chosen image areas positive for viral signals, it was not possible to state on the percentage of infected epithelial cells in our experiments. However, combining confocal microscopy, mathematical segmentation and molecular biology experiments our results suggest that R5- and X4-tropic viruses enter epithelial cells but have different areas of location. In our work, X4- and R5-tropic viruses seem to exhibit different kinetic of infection of HEC-1A cells, suggesting that they use different ways to penetrate into these cells. Endocervical HEC-1A cells do express at their surface CXCR4 co-receptor but not CD4 receptor and CCR5 co-receptor. Our data demonstrate that X4-tropic viruses do use CXCR4 co-receptor, since neither RNA nor DNA was detected into infected cells after treatment by rhSDF-1 $\alpha$ , the natural ligand of CXCR4. At the opposite, the blockage of CCR5 by rhRANTES did not change the penetration of R5-tropic constructs into endocervical cells, since intra-cellular particles were observed by confocal microscopy and HIV RNA could be quantified by RT-PCR. Indeed, confocal microscopy and mathematical analyses of z stacks, allow to state that viral particles are inside the cells and not at the external surface of cells. Furthermore, after penetration into HEC-1A cells R5-tropic viruses remain localized near the plasma membrane and no intracellular LTR DNA was detected contrary to X4 LTR DNA. Interestingly, our X4 constructs were visualized in the cellular nucleus, even after genomic reverse transcription and nuclear import. The eGFP or dsRedExpress marker is linked to Vpr gene. Indeed, Vpr has been shown to be important in both cell apoptosis by inducing cellular cycle stop and HIV LTR trans-activation [31,32]. Moreover, this regulatory protein is implicated into the nuclear import of the pre-integration complex [33–35], and is associated with viral RNA genome [32,33,35]. These studies permit us to suggest that the fusion protein Vpr-eGFP/dsRedExpress expressed by the chimeric viruses used here can be imported into the nucleus of cells, probably as a component of the pre-integration complex, and be detected by confocal microscopy.

Since no viral production could be detected in the supernatant of HEC-1A cells in contact with HIV (data not shown), our results demonstrate that endocervical epithelial cells can be non-productively infected by X4- and R5-tropic HIV-1 strains. Our results confirm findings from Berlier et al. [35], suggesting that X4-tropic viruses can penetrate into HEC-1A cells and be sequestered after genomic integration without viral production. Our present work brings new data concerning the entry and intra-cellular presence of free R5 particles assessed by confocal microscopy and HIV RNA quantification. Another new finding is the observation by confocal microscopy of the ability of HEC-1A cells to transmit X4- and R5-tropic viruses to activated-PBMC. This is in accordance with recent findings suggesting that X4-tropic strains can be detected in primary infected persons [36].

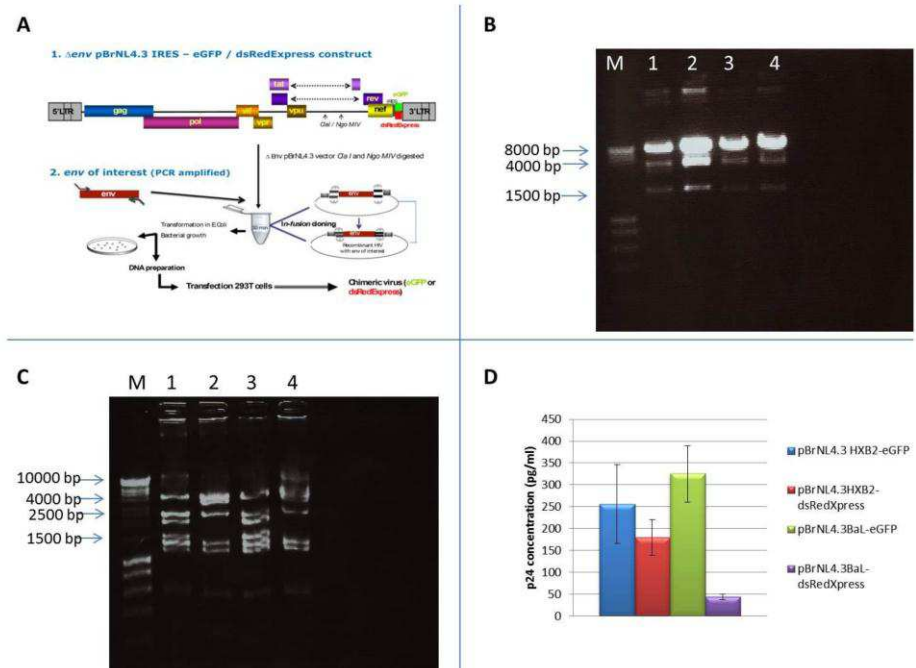


Following the observation that HEC-1A infection by HIV-1 was not productive, we evaluated the potential ability of the epithelial reservoir to be activated under a pro-inflammatory environment. For this, X4 and R5 infected-endocervical cells were treated by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , since these cytokines are known to promote CCL20 secretion by EC [18,37]. We show here that HIV-1 replication was not enhanced (viral RNA and DNA) by the presence of pro-inflammatory cytokines.

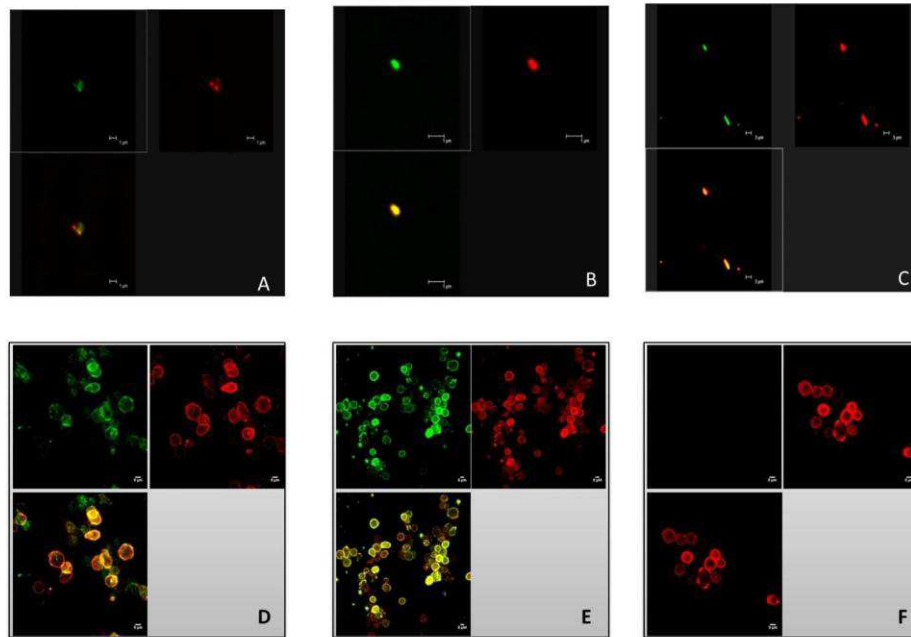
As a whole, we suggest here that X4-tropic viruses can penetrate into HEC-1A cells by using the CXCR4 co-receptor by membranes fusion, reverse transcribe and integrate their genome without complete replication productive cycle, whereas R5-tropic viral particles enter into endocervical cells probably by using alternative receptors leading to the transcytosis of viruses through the endocervical mucosa, without starting a replication cycle into these cells, as was suggested by others [38–41]. Both R5- and to a less extend X4-tropic strains are transmitted to permissive immune-competent cells as suggested by other authors [42,43]

Most reports dedicated to the study of virus-cells interactions at the mucosal have used laboratory or blood-derived strains that are poorly representative of the infectious seminal-derived strain. Indeed, virus found in the genital tract can exhibit distinct genetic characteristics [22,44–47] especially in the C2/V5 region of gp120 of viruses from seminal cells and plasma. A recent study suggest the transmitted particles have specific mean characteristics in terms of isoelectric points, numbers of putative N-linked glycosylation sites and co-receptor tropism [48]. Even if the exact source of this transmitted strain is still debated (Health et al., 2010), it would appear crucial to use seminal strains for the study of heterosexual transmission in *in vitro* models, at least to confirm results obtained with commonly used laboratory strains. In our work we attempt to use a complete gp160 amplified from seminal plasma in our constructs. Unfortunately, we were unable to obtain a stable replicative chimeric virus (data not shown). It may be due to the amplification of a defective particle mutated on env gene unable to enter or replicate in the cells. It cannot also be excluded that some primary sequences may not be functional in the context of the vector used here. Additional experiments are required to overcome these difficulties. Additional experiments are required to evaluate the role of cell-associated virus in mucosal transmission using our standardized protocol.

As a whole, our standardized model of epithelial cells infection combined to confocal microscopy and mathematical approach, could contribute to the understanding of the role of endocervical epithelial cells in the selection of R5-tropic viruses during heterosexual transmission. This model would also be a useful tool to evaluate the efficacy of various compounds such as neutralizing antibodies or microbicides to block the mucosa crossing.

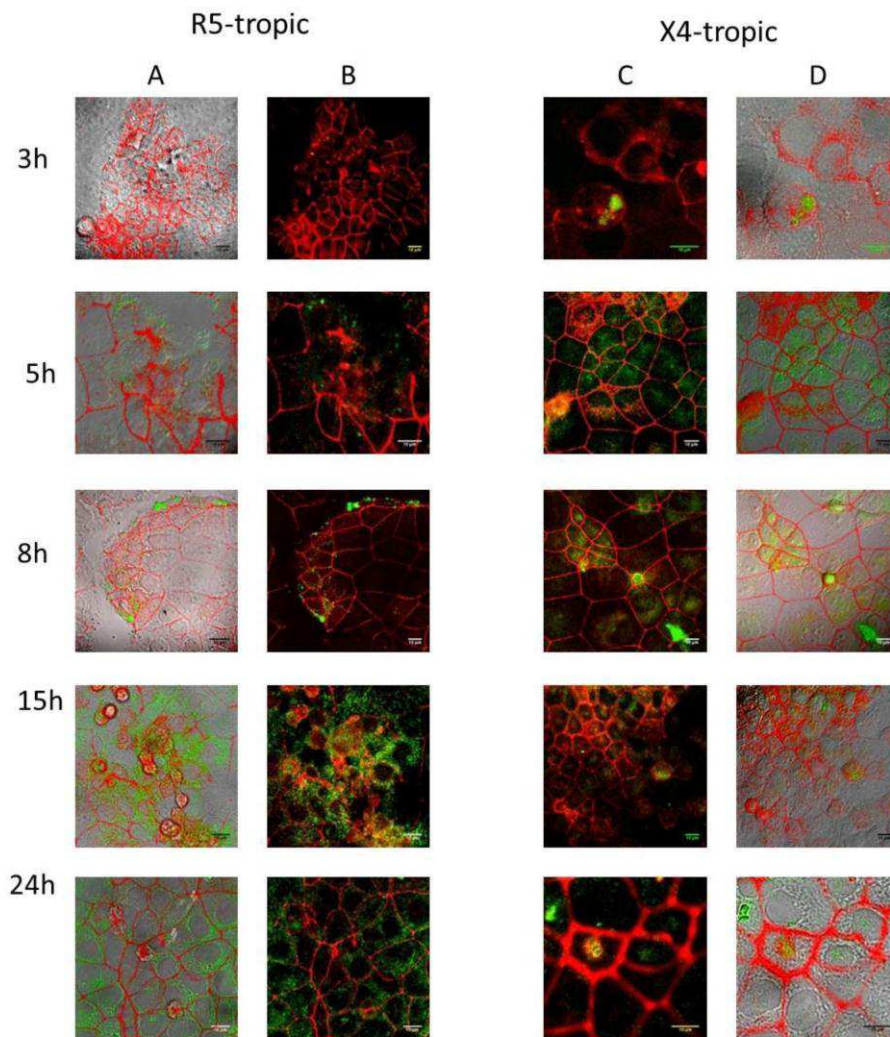


**Figure 1.** Protocol used for the construction of a chimeric virus, according to Münch et al. 2007 (A). Restriction analysis of pBrNL4.3-env-eGFP/dsRedExpress vector by enzymatic digestion for 1 h by EcoRI (B) or by HindIII (C). M: Size marker (Hyperladder I); Lane 1: pBrNL4.3-HXB2-eGFP; Lane 2: pBrNL4.3-BaL-eGFP; Lane 3: pBrNL4.3-HXB2-dsRedExpress; Lane 4: pBrNL4.3-BaL-dsRedExpress. Quantification of p24 in supernatants of HEK 293 cells after transfection (D). Results are representative of 3 independent transfection experiments and each p24 measurement was performed in duplicate.

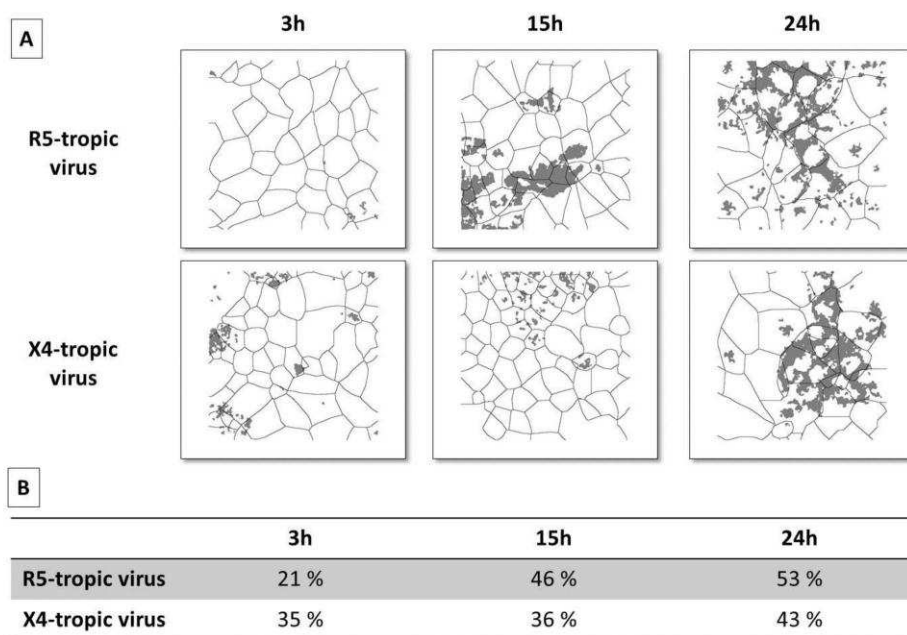


**Figure 2.** Visualization of free particles (A-C) and cell associated (D-F) chimeric viruses by confocal microscopy: pBrNL4.3-BaL-eGFP cell-free (A) or cell-associated (D), pBrNL4.3HXB2-dsRedExpress cell free (B) or cell-associated (E), cell free (C) pBrNL4.3HXB2-eGFP, mock infected PBMC (F). UL: fluorescence of chimeric virus, UR: p24-antibody fluorescence (A-C) or anti-CD26 conjugate fluorescence (D-F), LL: merge; eGFP and dsRedExpress are colored in green; p24 appears in red (A-C).

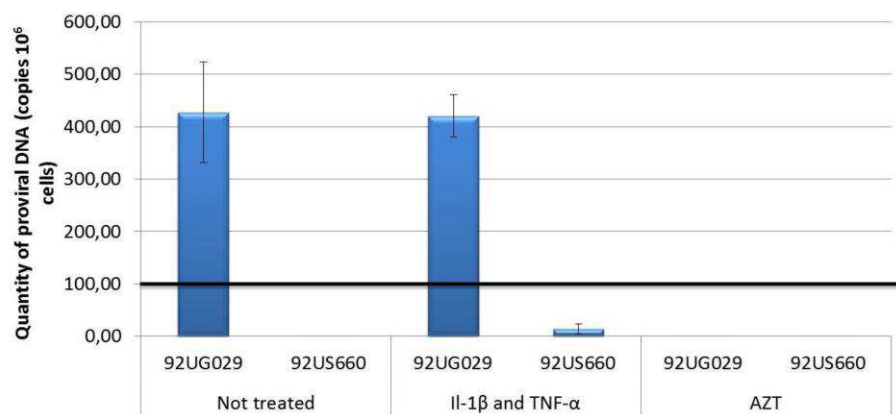




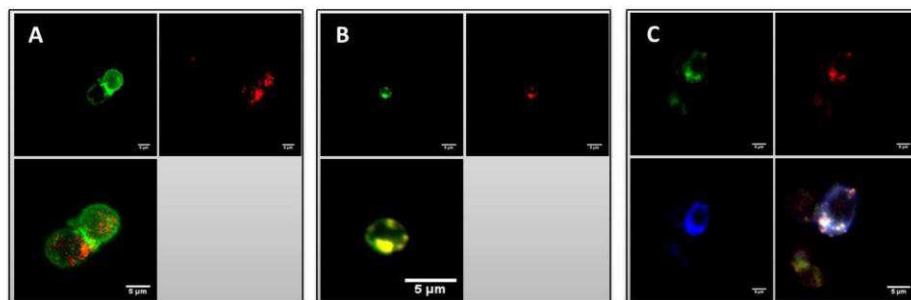
**Figure 3.** Visualization of HEC-1A kinetic of infection by X4 and R5 chimeric viruses by confocal microscopy. HEC-1A cells were infected for 3h, 5h, 8h, 15h and 24h by R5-tropic pBrNL4.3-Bal-eGFP chimeric viruses (columns A and B) or X4-tropic pBrNL4.3-HXB2-eGFP chimeric viruses (columns C and D). ZO-1 cellular proteins are colored in red, eGFP signals appear in green. A and D columns correspond to Differential Interference Contrast (DIC) representations. Each experiment was done in triplicate.



**Figure 4.** Segmentation and quantification of HEC-1A infected by X4- and R5-tropic chimeric viruses for 3 h, 15 h and 24 h, by using the mathematical program combining watershed algorithm and cells and viruses segmentations: segmented pictures (A) and respective rates of infected cells at each time of the infection (B). Each picture is representative of the global analysis. At least 6 series and 80 to 150 z stacks per experiment were investigated. A total of 154 to 569 cells per condition were analyzed. Chimeric viruses appear in grey.



**Figure 5.** Results of proviral DNA quantification in cells 24 h after infection by X4- or R5-tropic virus. AZT was added 2h before infection (10 $\mu$ M). Pro-inflammatory cytokines were added 24h post-infection: Il-beta (25ng/ml) + TNF-alpha (10ng/ml). Results are representatives of 6 independent experiments; each of them was performed in duplicate as well as the measurement of proviral DNA.



**Figure 6.** Transmission experiments of HIV from infected HEC-1A to uninfected PBMC. HEC1-A were infected for 24h with either pBrNL4.3-HXB2-dsRedExpress (A), pBrNL4.3-BaL-eGFP (B) or both pBrNL4.3-BaL-eGFP and pBrNL4.3-HXB2-dsRedExpress chimeric viruses (C). HEC-1A cells were then co-cultured with activated PBMC for 24h. UL: anti-CD26 antibody (AF 488) (A), eGFP expression (B) and anti-CD26 antibody (AF 350) (C). UR: dsRedExpress expression (A, C) and anti-CD26 antibody (AF 555) (B). LL: overlay of both signals (A-B) and eGFP expression (C). LR: overlay of the three signals.

## References

- [1] P.J. Southern, J.E. Horbul, B.R.L. Miller, D.M. Maher, Coming of age: reconstruction of heterosexual HIV-1 transmission in human ex vivo organ culture systems, *Mucosal Immunol.* 4 (2011) 383–396.
- [2] F. Hladik, M.J. McElrath, Setting the stage: host invasion by HIV, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 447–457.
- [3] C. Kaushic, V.H. Ferreira, J.K. Kafka, A. Nazli, HIV infection in the female genital tract: discrete influence of the local mucosal microenvironment, *Am. J. Reprod. Immunol.* 63 (2010) 566–575.
- [4] M. Norvell, G. Benrubi, R. Thompson, Investigation of microtrauma after sexual inter... [*J Reprod Med.* 1984] - PubMed - NCBI, (1984).
- [5] M. Bomsel, Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier, *Nat. Med.* 3 (1997) 42–47.
- [6] A.L. Howell, R.D. Edkins, S.E. Rier, G.R. Yeaman, J.E. Stern, M.W. Fanger, et al., Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract, *J. Virol.* 71 (1997) 3498–3506.
- [7] M.D. Bobardt, U. Chatterji, S. Selvarajah, B. Van der Schueren, G. David, B. Kahn, et al., Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells, *J. Virol.* 81 (2007) 395–405.
- [8] P. Lawrence, D. Portran, R. Terrasse, S. Palle, T. Olivier, J. Fantini, et al., Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma, *AIDS.* 26 (2012) 785–796.
- [9] D.J. Anderson, J.A. Politch, A.M. Nadolski, C.D. Blaskewicz, J. Pudney, K.H. Mayer, Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention, *AIDS.* 24 (2010) 163–187.
- [10] M. Eckhardt, M. Anders, W. Muranyi, M. Heilemann, J. Krijnse-Locker, B. Müller, A SNAP-tagged derivative of HIV-1--a versatile tool to study virus-cell interactions, *PLoS ONE.* 6 (2011) e22007.
- [11] N. Arhel, A. Genovesio, K.-A. Kim, S. Miko, E. Perret, J.-C. Olivo-Marin, et al., Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes, *Nat. Methods.* 3 (2006) 817–824.
- [12] E.M. Campbell, O. Perez, M. Melar, T.J. Hope, Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell, *Virology.* 360 (2007) 286–293.
- [13] R. Shen, H.E. Richter, R.H. Clements, L. Novak, K. Huff, D. Bimczok, et al., Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Virol.* 83 (2009) 3258–3267.



- [14] B. Müller, J. Daecke, O.T. Fackler, M.T. Dittmar, H. Zentgraf, H.-G. Kräusslich, Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative, *J. Virol.* 78 (2004) 10803–10813.
- [15] J. Münch, E. Rücker, L. Ständker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, et al., Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection, *Cell.* 131 (2007) 1059–1071.
- [16] M. Merbah, A. Introini, W. Fitzgerald, J.-C. Grivel, A. Lisco, C. Vanpouille, et al., Cervico-vaginal tissue ex vivo as a model to study early events in HIV-1 infection, *Am. J. Reprod. Immunol.* 65 (2011) 268–278.
- [17] K.K. Ariën, J.K. Kyongo, G. Vanham, Ex vivo models of HIV sexual transmission and microbicide development, *Curr. HIV Res.* 10 (2012) 73–78.
- [18] M. Cremel, W. Berlier, H. Hamzeh, F. Cognasse, P. Lawrence, C. Genin, et al., Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 158–166.
- [19] H. Saïdi, G. Magri, N. Nasreddine, M. Réquena, L. Bélec, R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission, *Virology.* 358 (2007) 55–68.
- [20] Y. Gavet, J.-C. Pinoli, VISUAL PERCEPTION BASED AUTOMATIC RECOGNITION OF CELL MOSAICS IN HUMAN CORNEAL ENDOTHELIUMMICROSCOPY IMAGES, *Image Analysis & Stereology.* 27 (2011) 53–61.
- [21] W. Berlier, T. Bourlet, P. Lawrence, H. Hamzeh, C. Lambert, C. Genin, et al., Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV, *J. Med. Virol.* 77 (2005) 465–474.
- [22] P. Lawrence, A. Zimmer, S. Paul, Infection muqueuse par le virus VIH-1: mécanismes, conséquences, perspectives de vaccination, *Revue Francophone Des Laboratoires.* 2009 (2009) 45–54.
- [23] B. Friedrich, G. Li, N. Dziuba, M.R. Ferguson, Quantitative PCR used to assess HIV-1 integration and 2-LTR circle formation in human macrophages, peripheral blood lymphocytes and a CD4+ cell line, *Virol. J.* 7 (2010) 354.
- [24] M.D. Abramoff, P.J. Magalhães, S.J. Ram, Image processing with ImageJ, *Biophotonics International.* 11 (2004) 36–42.
- [25] J. Weber, J. Weberova, M. Carobene, M. Mirza, J. Martinez-Picado, P. Kazanjian, et al., Use of a novel assay based on intact recombinant viruses expressing green (EGFP) or red (DsRed2) fluorescent proteins to examine the contribution of pol and env genes to overall HIV-1 replicative fitness, *J. Virol. Methods.* 136 (2006) 102–117.
- [26] R. Van den Bergh, S. Morin, H.J. Sass, S. Grzesiek, M. Vekemans, E. Florence, et al., Monocytes contribute to differential immune pressure on R5 versus X4 HIV through the adipocytokine visfatin/NAMPT, *PLoS ONE.* 7 (2012) e35074.

- [27] D.C. Montefiori, Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV, and SHIV in luciferase reporter gene assays, *Curr Protoc Immunol*. Chapter 12 (2005) Unit 12.11.
- [28] R.C. Gonzalez, R.E. Woods, *Digital Image Processing*, 2nd ed., Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., Boston, MA, USA, 2001.
- [29] P. Soille, *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*, 2nd ed., Springer-Verlag New York, Inc., Secaucus, NJ, USA, 2003.
- [30] J. Münch, D. Rajan, M. Schindler, A. Specht, E. Rücker, F.J. Novembre, et al., Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses, *J. Virol.* 81 (2007) 13852–13864.
- [31] M.E. Rogel, L.I. Wu, M. Emerman, The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection, *J. Virol.* 69 (1995) 882–888.
- [32] J.V. Fritz, D. Dujardin, J. Godet, P. Didier, J. De Mey, J.-L. Darlix, et al., HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between Vpr and Gag, *J. Virol.* 84 (2010) 1585–1596.
- [33] A.D. Frankel, J.A. Young, HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 1–25.
- [34] S. Popov, M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M.A. Lee, L. Ratner, et al., Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex, *EMBO J.* 17 (1998) 909–917.
- [35] E. Le Rouzic, S. Benichou, The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle, *Retrovirology.* 2 (2005) 11.
- [36] S. Gianella, S.R. Mehta, J.A. Young, M.V. Vargas, S.J. Little, D.D. Richman, et al., Sexual transmission of predicted CXCR4-tropic HIV-1 likely originating from the source partner's seminal cells, *Virology.* (2012).
- [37] W. Berlier, M. Cremel, H. Hamzeh, R. Lévy, F. Lucht, T. Bourlet, et al., Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV, *Hum. Reprod.* 21 (2006) 1135–1142.
- [38] E. Stoddard, G. Cannon, H. Ni, K. Karikó, J. Capodici, D. Malamud, et al., gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission, *J. Immunol.* 179 (2007) 3126–3132.
- [39] A. Alfsen, M. Bomsel, HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25649–25659.
- [40] G.R. Yeaman, S. Asin, S. Weldon, D.J. Demian, J.E. Collins, J.L. Gonzalez, et al., Chemokine receptor expression in the human ectocervix: implications for infection by the human immunodeficiency virus-type I, *Immunology.* 113 (2004) 524–533.
- [41] P. Gallay, Syndecans and HIV-1 pathogenesis, *Microbes Infect.* 6 (2004) 617–622.

- [42] J.-C. Grivel, R.J. Shattock, L.B. Margolis, Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper?, *J Transl Med.* 9 Suppl 1 (2011) S6.
- [43] L. Margolis, R. Shattock, Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved?, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 312–317.
- [44] R.A. Byrn, D. Zhang, R. Eyre, K. McGowan, A.A. Kiessling, HIV-1 in semen: an isolated virus reservoir, *Lancet.* 350 (1997) 1141.
- [45] E.L. Delwart, J.I. Mullins, P. Gupta, G.H. Learn Jr, M. Holodniy, D. Katzenstein, et al., Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen, *J. Virol.* 72 (1998) 617–623.
- [46] J. Ghosn, J.-P. Viard, C. Katlama, M. de Almeida, R. Tubiana, F. Letourneur, et al., Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men, *AIDS.* 18 (2004) 447–457.
- [47] L.H. Ping, M.S. Cohen, I. Hoffman, P. Vernazza, F. Seillier-Moiseiwitsch, H. Chakraborty, et al., Effects of genital tract inflammation on human immunodeficiency virus type 1 V3 populations in blood and semen, *J. Virol.* 74 (2000) 8946–8952.
- [48] D.M. Butler, W. Delport, S.L. Kosakovsky Pond, M.K. Lakdawala, P.M. Cheng, S.J. Little, et al., The origins of sexually transmitted HIV among men who have sex with men, *Sci Transl Med.* 2 (2010) 18re1.

### III. Synthèse

La visualisation de la transmission sexuelle de HIV-1 de l'homme vers la femme est complexe. Dans cet article nous proposons un modèle de virus chimérique, fluorescent, réplcatif et infectieux sur plusieurs cycles de réplication, permettant de visualiser l'infection de la muqueuse génitale féminine et des cellules immunitaires sous-muqueuses, après plusieurs heures de contact. De plus, l'outil virologique proposé ici permet de différencier les virus à tropisme X4 et R5 et de visualiser l'infection de cellules épithéliales ou immunitaires par les deux types de virus, permettant ainsi d'étudier la différence de cinétique d'infection des cellules par les deux souches virales et d'émettre des hypothèses sur leurs mécanismes d'infection.

Nous montrons sur notre modèle de muqueuse endocervicale reconstruite que les virus à tropisme X4 sont capables de pénétrer dans les cellules épithéliales endocervicales, d'entrer dans le noyau cellulaire et de rétro-transcrire leur génome viral en ADN proviral. L'infection de la muqueuse endocervicale par un virus à tropisme X4 n'induit pas d'infection productive des cellules épithéliales et permet une très faible transmission cellule-cellule du virus aux cellules immunitaires placées en basal. Après infection de la muqueuse endocervicale par le virus à tropisme R5, nous pouvons également visualiser par microscopie confocale la présence de particules virales dans les cellules épithéliales. En revanche, les particules virales à tropisme R5 ne pénètrent pas dans le noyau cellulaire et ne rétro-transcrivent pas leur génome. En effet, même après 24h de contact, les virions à tropisme R5 montrent toujours une localisation périnucléaire dans les cellules épithéliales. Ces données sont supportées par la détection d'ARN viral dans les cellules épithéliales infectées par les deux souches virales et par le fait que l'ADN proviral n'a pu être détecté que dans les cellules infectées par les virus à tropisme X4.

L'infection des cellules épithéliales n'étant pas productive, nous avons tenté de réactiver par l'ajout de cytokines pro-inflammatoires la transcription de l'ADN proviral présent dans les cellules infectées par les souches HIV à tropisme X4. L'ajout d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  n'a pas modifié la quantité d'ARN ni d'ADN proviral retrouvé dans les cellules infectées par les virus à tropisme R5 et X4. Dans l'optique de comprendre le devenir des particules virales entrées dans les cellules endocervicales, nous avons réalisé des expériences de transmission par contact direct des cellules épithéliales infectées avec des cellules immunitaires activées, saines. Les particules virales à tropisme R5 sont capables d'être transmises efficacement depuis les cellules épithéliales endocervicales infectées vers les cellules immunitaires sous-muqueuses, après contact direct cellule-cellule. Ces résultats suggèrent que la muqueuse endocervicale pourrait jouer un rôle dans la séquestration des virus à



tropisme X4, et donc dans la sélection à tropisme R5, comme cela a été proposé précédemment par notre équipe [153].

Nous démontrons également qu'en utilisant le virus chimérique décrit dans ce travail, il est possible de détecter la localisation des particules virales au sein de la muqueuse et de segmenter, en s'aidant d'un modèle mathématique, les différents éléments marqués afin de quantifier le nombre de cellules infectées.

Etant donné les difficultés rencontrées pour développer un traitement préventif ou curatif contre HIV, notamment au niveau des muqueuses génitales féminines, et l'importance de la transmission hétérosexuelle dans la pandémie de HIV, la compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission de virus libre ou associé aux cellules est indispensable. Ainsi, le virus chimérique développé et présenté dans cette étude constitue un outil de première importance pour étudier les mécanismes impliqués dans la transmission de HIV de l'homme vers la femme par voie sexuelle. Cet outil peut être utilisé tant pour l'étude de la transmission du virus libre que pour l'étude du virus associé aux cellules. De plus, il peut être utilisé pour étudier l'infection différentielle des virus à tropisme X4 ou R5 au sein de muqueuses génitales féminines. Nous montrons notamment que la visualisation d'au moins 3 fluorochromes différents est possible avec ce virus chimérique, par microscopie confocale, ce qui permet d'étudier les interactions entre les virus et les divers éléments cellulaires. Nous montrons également qu'il est possible de segmenter automatiquement les différents éléments fluorescents, permettant ainsi de standardiser l'étude de la position de chaque élément d'intérêt et de leurs interactions.

Ce virus chimérique, associé aux techniques de microscopie confocale et de segmentation mathématique, est également un excellent outil d'évaluation de la capacité de nouvelles stratégies de traitement des muqueuses génitales féminines, telles que les microbicides ou les anticorps neutralisants destinés à bloquer la transmission sexuelle du virus libre ou associé aux cellules.

# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

HIV, responsable de l'un des fléaux les plus dévastateurs à l'échelle mondiale, se transmet majoritairement par voie hétérosexuelle de l'homme vers la femme. Ce virus conduit à la maladie sida, incurable à l'heure actuelle. La transmission de HIV de l'homme vers la femme implique divers acteurs : le virus, le sperme et la muqueuse génitale féminine, qui interagissent entre eux selon des mécanismes complexes et partiellement inexpliqués. La compréhension des mécanismes conduisant à l'infection par HIV par voie hétérosexuelle de l'homme vers la femme permettra de développer de nouvelles stratégies de traitement par voie génitale, telles que les microbicides.

Il existe 3 types de tropisme pour HIV, en fonction de l'utilisation préférentielle du corécepteur cellulaire, CXCR4 (tropisme X4), CCR5 (tropisme R5) ou des deux corécepteurs indifféremment (dual-tropique) [125]. Plusieurs études ont montré que les personnes en situation de primo-infection présentent très majoritairement des particules virales à tropisme R5, alors celles qui contaminent sont plutôt infectées par des virions à tropisme X4 [44,139,147–149]. De plus, les sujets présentant une mutation délétère dans le gène codant le corécepteur CCR5 semblent protégés de l'infection par HIV [89]. Ces observations suggèrent qu'il existe une sélection des virus à tropisme R5 lors de la transmission de HIV. Malgré de nombreuses investigations les mécanismes de cette sélection ne sont pas clairement élucidés [127]. Le virus, quel que soit son tropisme, peut être retrouvé sous deux formes dans l'organisme : virus libre et virus associé aux cellules [16,163]. Dans le sperme, les deux formes du virus sont retrouvées dans deux compartiments différents : le compartiment plasmatique, composé du plasma séminal et contenant le virus libre ; et le compartiment cellulaire, contenant le virus associé aux NSMC [162,163]. Il a été démontré que les particules virales libres ou associées aux cellules, présentes dans le sperme, sont capables de transmettre l'infection de l'homme contaminé vers la femme saine, lors d'un rapport hétérosexuel. Pourtant, l'implication et l'importance respectives de la transmission de virus libre et de virus associé aux cellules dans la contamination de l'organisme sain, de même que l'établissement de l'infection systémique, sont encore mal connues [9,139,148,162,164,165,204,212,222]. Il est donc indispensable d'identifier le rôle respectif de chacune de ces formes virales présentes dans le sperme infecté, ainsi que les mécanismes de la sélection des souches à tropisme R5 dans la transmission hétérosexuelle de HIV pour comprendre les mécanismes de sa dissémination dans l'organisme, et développer de nouvelles stratégies prophylactiques.

Lors de la transmission de l'homme vers la femme, HIV, au contact de la muqueuse génitale féminine, peut avoir pour cibles les cellules épithéliales génitales féminines ou les cellules immunitaires qui la composent. La muqueuse génitale féminine est majoritairement composée de cellules épithéliales, et divisée en trois zones : i) la muqueuse exocervicale et vaginale, multicouche de cellules squameuses ; ii) la muqueuse endocervicale, composée d'une monocouche de cellules

non squameuses ; iii) la zone de transformation, qui fait la jonction entre les deux types de muqueuses. Elle contient également divers types de cellules immunitaires, toutes cibles pour HIV-1 [16,184,191]. Le virus est capable de traverser la muqueuse génitale féminine pour établir l'infection systémique selon différents modes de franchissement : traversée via une brèche dans la muqueuse, transmigration, transcytose, et infection de cellules immunitaires ou de cellules épithéliales [15,167,191]. Cependant, les mécanismes de passage du virus à travers la muqueuse génitale féminine lors d'une transmission de l'homme vers la femme, *in vivo*, n'ont pas encore été élucidés. La capacité des cellules épithéliales génitales féminines à être infectées productivement par HIV est notamment très controversée [115,159,169,215,220,225]. En revanche, il semble que la transcytose [96,196] et la transmigration soient respectivement les modes de passage du virus libre et associé aux cellules [221,222] les plus probables sous l'angle physiopathologique, en absence de brèche dans la muqueuse.

Les interactions entre les trois acteurs majeurs de la transmission hétérosexuelle de HIV : virus, sperme et muqueuse génitale féminine, sont complexes et difficiles à définir clairement. Ce travail de thèse a donc consisté à développer et fournir des outils permettant d'étudier par visualisation directe le passage du virus à travers la muqueuse génitale féminine et l'établissement de l'infection systémique. Les outils mis au point et décrits ici sont destinés i) à comprendre les mécanismes de la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme, ce qui permettra de développer des stratégies thérapeutiques adaptées, et ii) à tester l'efficacité de molécules à visée microbicide et autres traitements muqueux en cours de développement.

Dans un premier temps, nous avons étudié et visualisé par microscopie confocale les mécanismes impliqués dans la transmigration de cellules immunitaires, en l'occurrence des monocytes/macrophages et des lymphocytes, composants majoritaires des NSMC [16,202,261,262]. Les monocytes/macrophages sont préférentiellement infectés par des virus à tropisme R5 dans l'organisme, alors que les lymphocytes sont plutôt infectés par des virus à tropisme X4 [115]. Nous observons dans l'article I que les monocytes/macrophages sont capables de transmigrer plus efficacement que les lymphocytes à travers la muqueuse endocervicale, démontrant ainsi que la transmigration préférentielle des monocytes/macrophages, principalement infectés par HIV à tropisme R5, constitue une étape de cette sélection lors de la transmission de HIV de l'homme vers la femme [259].

Par ailleurs, le plasma séminal est riche en protéines ; il contient de nombreux facteurs qui agissent sur la promotion ou l'inhibition de l'infection par HIV, notamment en induisant certains changements au niveau de la muqueuse génitale féminine (e.g. production de cytokines par les

cellules épithéliales, neutralisation du pH de la muqueuse) [16,185,191,198,199,207,211]. L'action du plasma séminal dans la transmission hétérosexuelle de HIV ainsi que dans la sélection R5 est largement controversé et nécessite des investigations supplémentaires pour être clairement décrit [185,191,207,209–211]. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact du plasma séminal sur l'étanchéité de la muqueuse et sur la transmigration des cellules immunitaires [259]. Nous avons observé par microscopie confocale et démontré par mesure de la résistance *trans*-épithéliale de la muqueuse génitale féminine que le plasma séminal augmente l'étanchéité de la muqueuse et favorise les jonctions cellule-cellule. Ces modifications de perméabilité de la muqueuse bloquent la transmigration des lymphocytes et induisent une diminution de la transmigration des monocytes/macrophages, en augmentant la fixation des cellules immunitaires à la surface des cellules épithéliales, probablement via une liaison avec les récepteurs ICAM-2, ICAM-3, CD11a ou CD50 [221]. Le plasma séminal induit une fixation plus forte des cellules immunitaires sur la muqueuse génitale féminine, bloquant ainsi la transmigration des lymphocytes qui ne vont pas être capables de transmettre l'infection. En revanche, après contact de la muqueuse avec du plasma séminal, les monocytes/macrophages sont toujours en mesure de traverser efficacement la muqueuse et de transmettre le virus aux cellules immunitaires sous-muqueuses. Nous démontrons ici que le plasma séminal joue un rôle essentiel dans l'inhibition de la transmission de HIV et la sélection de souches à tropisme R5.

Dans cette étude, nous avons visualisé les cellules immunitaires au cours de la transmigration, présentes au sein de la muqueuse, par microscopie confocale. Cette technique présente l'avantage de permettre la visualisation des cellules localisées dans la profondeur de la muqueuse génitale féminine. En revanche, le marquage des cellules immunitaires par des anticorps couplés à un fluorochrome, présente un risque de détection de fluorescence non spécifique du marquage. Ainsi, afin d'éviter la détection de faux positifs et de déterminer plus précisément la cinétique de transmigration des cellules immunitaires à travers la muqueuse génitale féminine, il serait intéressant de pouvoir faire ces expériences par visualisation en temps réel, en détectant des cellules infectées directement fluorescentes. Cependant, ce type d'expérience est compliqué à mettre en place étant donné la nécessité d'avoir accès à un microscope confocal utilisable dans un laboratoire de niveau de sécurité 3 pour visualiser la transmission de HIV sur cellules vivantes. De plus, cette étude nécessite de bénéficier d'un modèle de virus HIV associé aux cellules, directement fluorescent, utilisable sur cellules, sans nécessiter de marquage anticorps couplé supplémentaire, et détectable à long terme.

Afin de pallier les limites des outils virologiques actuellement disponibles, nous avons développé, en collaboration avec l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique), un virus HIV

chimérique, à tropisme X4 et R5, réplcatif et infectieux, exprimant une protéine virale de fusion fluorescente, détectable sur plusieurs cycles de réplication. Ce virus chimérique permet sa détection directe par microscopie confocale, sans marquage anticorps, sous forme de virus libre ou associé aux cellules. Dans l'article II, nous avons, dans un premier temps, mis en contact le virus chimérique construit avec un modèle cellulaire simplifié de transmission hétérosexuelle, sur une lignée de cellules épithéliales endocervicales bien caractérisées. Ainsi, nous avons effectué une cinétique de mise en contact des virus chimériques à tropismes X4 et R5 avec les cellules endocervicales, et observé par microscopie confocale que ces deux types de virus sont capables de pénétrer dans les cellules épithéliales, selon une cinétique différente, et montrent une localisation différente dans la cellule. En effet, les virus à tropisme X4 entrent plus rapidement dans les cellules épithéliales que le virus à tropisme R5 et pénètrent dans le noyau cellulaire, contrairement aux virus à tropisme R5 qui restent en périphérie du noyau.

Nous avons confirmé ces observations par la quantification par RT PCR de la présence d'ARN viral et d'ADN proviral dans des cellules épithéliales endocervicales infectées par HIV à tropismes X4 et R5. Nous avons ainsi démontré la présence d'ARN viral en quantité similaire dans les cellules infectées par HIV à tropisme X4 et R5. De plus, nous avons détecté de l'ADN proviral dans les cellules infectées par les virus à tropisme X4 mais pas dans les cellules mises en contact avec les particules virales à tropisme R5. L'absence d'ADN proviral dans les cellules infectées, en présence d'AZT, inhibiteur de la transcription inverse, nous a permis de prouver que l'ADN proviral détecté dans les cellules infectées par HIV à tropisme X4, sans AZT, est spécifique de l'ADN proviral néo-synthétisé dans les cellules à partir du génome viral HIV. La présence d'ARN viral dans les cellules infectées par les deux souches virales et d'ADN proviral dans les cellules infectées par les virus à tropisme X4 confirme la localisation cellulaire visualisée par microscopie confocale avec nos virus chimériques, à savoir que les deux types de virus sont capables de pénétrer dans les cellules endocervicales, et que seuls les virus à tropisme X4 sont capables de rétro-transcrire leur génome. Ainsi, nous démontrons par microscopie confocale et confirmons par des techniques de biologie moléculaire que les cellules épithéliales endocervicales sont les premières cellules cibles de HIV lors d'une transmission hétérosexuelle de l'homme vers la femme. De plus, nous montrons que les virus à tropisme X4 et R5 pénètrent dans ces cellules épithéliales par des mécanismes différents et n'ont pas le même comportement dans la cellule. L'absence de particules virales dans le surnageant des cellules infectées indique par ailleurs que le phénomène observé est une infection non productive des cellules. Cela illustre que les cellules épithéliales génitales féminines jouent un rôle essentiel de barrière à l'infection lors de la transmission sexuelle de HIV.

L'entrée et le comportement différentiels des virus à tropisme X4 et R5 dans les cellules endocervicales après contact avec la muqueuse suggèrent que ces deux types de particules virales empruntent des voies de pénétration et d'infection différentes. Nous savons que les cellules épithéliales endocervicales n'expriment ni le récepteur principal de HIV, CD4, ni le corécepteur CCR5 à leur surface [153]. Il a été montré en effet que les cellules endocervicales produisent la molécule CCR5 au niveau intracellulaire mais ne l'expriment pas au niveau de la membrane plasmique [153]. En revanche, ces cellules expriment divers récepteurs alternatifs de HIV, notamment GalCer [13,94,153,191], HSPG [56,96,170,191] et gp340 [101,191], ainsi que le corécepteur CXCR4 [153]. Le virus ne pouvant pénétrer dans ces cellules par son récepteur principal, nous avons voulu déterminer le corécepteur utilisé par des souches à tropisme X4 ou R5 à cette étape. Pour cela nous avons mis en présence des cellules épithéliales endocervicales avec rhSDF-1 $\alpha$  ou rhRANTES, ligands naturels de CXCR4 et CCR5 respectivement. Comme attendu, les virus à tropisme R5 sont capables de pénétrer dans les cellules épithéliales malgré la présence de rhRANTES, confirmant que ces souches virales n'entrent pas dans les cellules endocervicales via l'utilisation du corécepteur CCR5, non exprimé à leur surface. A l'inverse, l'absence d'ADN proviral dans les cellules traitées par rhSDF-1 $\alpha$  et mises en contact avec un virus à tropisme X4, a confirmé l'utilisation du corécepteur CXCR4 par cette souche virale pour pénétrer dans les cellules épithéliales endocervicales. Nous avons ainsi prouvé que les virus à tropisme X4 ou R5 utilisent des voies d'entrée différentes dans les cellules épithéliales endocervicales, mais sont bien tous deux capables d'entrer dans ces cellules, contrairement à ce qu'avait suggéré une autre étude moins approfondie publiée dans le laboratoire en 2005 [153], mais en accord avec d'autres travaux effectués depuis [97].

Il apparaît ainsi que la cinétique d'infection des cellules endocervicales n'est pas la même pour les virus à tropisme X4 et R5, et que ces deux souches virales utilisent des mécanismes d'entrée différents dans la cellule. En effet, les virus à tropisme X4 pénètrent dans la cellule via le corécepteur CXCR4 et rétro-transcrivent leur génome en ADN proviral. Ces données suggèrent que les virus à tropisme X4 empruntent une voie d'infection « classique » de pénétration dans la cellule par fusion des membranes et entrée dans le cycle de réplication. Les virus à tropisme CCR5, quant à eux, n'utilisent pas leur corécepteur principal pour pénétrer dans la cellule et n'entrent pas dans un cycle de réplication au sein des cellules épithéliales endocervicales, puisqu'ils restent en position périnucléaire et ne rétrotranscrivent pas leur génome en ADN proviral. Cela suggère qu'ils pénètrent dans les cellules épithéliales composant la muqueuse endocervicale par un mécanisme apparenté à la transcytose [96,196].

Afin de confirmer cette hypothèse, plusieurs expériences peuvent être mises en place. Les cellules épithéliales endocervicales n'exprimant pas CD4, il serait notamment intéressant d'étudier et



de visualiser par microscopie confocale les récepteurs et corécepteurs utilisés par les particules virales HIV à tropisme X4 et R5 pour pénétrer dans les cellules épithéliales. Pour cela, des études de visualisation par FRET pourraient être mises en place afin d'étudier la co-localisation des glycoprotéines d'enveloppe avec divers récepteurs alternatifs exprimés par les cellules épithéliales endocervicales, notamment GalCer, gp340 et HSPG.

Afin d'étudier le mode d'entrée du virus dans les cellules épithéliales et immunitaires composant la muqueuse génitale féminine, il serait également intéressant d'utiliser un pseudovirus « one-shot » du type de celui construit par l'équipe de Hope. En effet, ce pseudovirus exprime deux protéines de fusion : GFP-Vpr et S15-mCherry, la seconde étant une protéine cellulaire embarquée sur l'enveloppe virale lors du bourgeonnement [253]. Cette dernière permet de visualiser le mode d'entrée du virus dans la cellule : s'il utilise un procédé de fusion des membranes, S15-mCherry reste au niveau de la membrane cellulaire, s'il entre par un processus d'endocytose, elle est toujours visible à l'intérieur de la cellule. Grâce à notre technique de production de virus chimérique répliquatif et infectieux, détectable par microscopie confocale sur plusieurs cycles de réplication, il serait possible de développer un virus chimérique intégrant cette protéine de fusion, de sorte qu'elle soit également exprimée et détectée après plusieurs cycles de réplication. Cela permettrait de visualiser directement, par microscopie confocale, à partir des mêmes particules virales, les mécanismes de passage des virus à tropisme X4 ou R5, qu'ils soient libres ou associés aux cellules, à travers la muqueuse génitale féminine.

Il pourrait être également pertinent d'utiliser la microscopie électronique pour confirmer ces mécanismes de passage du virus à tropisme R5 par transcytose et d'entrée du virus à tropisme X4 par fusion des membranes. Par ce biais, on s'attendrait à observer des particules virales à tropisme R5 intactes au niveau cytoplasmique, alors que les particules virales à tropisme X4, seraient visualisées sous forme de capsides nues de localisation périnucléaire.

Dans notre travail, la microscopie confocale a permis de visualiser directement le virus chimérique construit, avec une forte résolution, et de reconstituer une image en 3 dimensions des cellules infectées. Cependant, l'analyse visuelle d'images de microscopie confocale et leur interprétation sont souvent dépendantes de l'opérateur. Afin de diminuer les risques d'erreurs liées à l'utilisateur, nous avons tenté de standardiser la détection de la fluorescence émise par les éléments d'intérêt, à savoir les virus chimériques et les contours cellulaires. Pour cela, nous avons développé une collaboration avec l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne (ENSMSE) et utilisé un programme mathématique capable de segmenter d'une part les contours cellulaires marqués par des anticorps fluorescents et d'autre part les particules virales fluorescentes. Après

segmentation, nous avons pu quantifier, de façon automatisée et standardisée, la proportion de cellules épithéliales infectées dans la monocouche endocervicale. La standardisation de la détection des divers éléments d'intérêt marqués par un fluorochrome permet une analyse approfondie, rapide, simple et reproductible des mécanismes étudiés.

La visualisation par microscopie confocale de l'infection des cellules épithéliales endocervicales et l'analyse mathématique des différents éléments marqués par fluorescence nous ont également permis de localiser les particules virales dans la profondeur des cellules infectées (données non montrées). Ainsi, même si le modèle cellulaire utilisé pour cette étude n'est pas le plus pertinent dans un contexte physiopathologique, cela permet de montrer qu'il est possible de visualiser le cheminement des particules virales dans la profondeur des cellules composant la muqueuse. Cette technique pourrait être appliquée à d'autres modèles *in vitro* ou *ex vivo* plus adaptés à l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV par le biais des cellules immunitaires de la muqueuse génitale féminine.

Nous avons démontré que l'infection des cellules épithéliales endocervicales induite par les particules virales à tropisme R5 ou X4 n'est pas productive. De plus, les virus à tropisme X4 entament un cycle de réplication abortif dans les cellules endocervicales, alors que les particules virales à tropisme R5 semblent pénétrer dans les cellules épithéliales par un mécanisme proche de la transcytose. Il reste à déterminer i) à quel stade de la réplication le cycle viral est arrêté après pénétration des virus à tropisme X4, ii) quels sont les mécanismes impliqués dans ce phénomène, et iii) que deviennent les particules virales ayant pénétré dans les cellules endocervicales.

Pour répondre à ces questions, notamment celle concernant le devenir des particules virales ayant pénétré dans les cellules épithéliales endocervicales, nous avons montré que l'ADN retrouvé dans les cellules épithéliales endocervicales infectées par HIV à tropisme X4 n'induisait pas de production de particules virales et semblait latent. Nous avons étudié la capacité de réactivation de l'ADN proviral, intégré ou non, retrouvé dans les cellules endocervicales infectées par les virus à tropisme X4, pour produire de nouvelles particules virales. Pour cela nous avons placé les cellules épithéliales infectées dans un environnement cytokinique pro-inflammatoire. Nous montrons que la présence d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  n'induit pas de réactivation du cycle de réplication de virus à tropisme X4 ayant pénétré dans les cellules endocervicales, illustrant du même coup le rôle important des cellules épithéliales endocervicales dans la séquestration des particules virales à tropisme X4 lors de la transmission hétérosexuelle de HIV [153].

Par ailleurs, Pearce-Pratt et coll. ont montré que le virus peut être transmis depuis les NSMC vers les cellules épithéliales génitales féminines, par contact direct cellule-cellule, via la mise en place

d'une synapse virologique [205]. De plus, les cellules endocervicales infectées, exprimant le récepteur alternatif gp340, peuvent infecter en *trans* des cellules cibles de HIV, notamment des LT CD4 [101], ce qui suggère que les particules virales ayant pénétré dans les cellules épithéliales génitales féminines pourraient être transmises aux cellules immunitaires sous-muqueuses par contact direct, sans être libérées dans le milieu extracellulaire. Afin de répondre clairement à la question du devenir de ces particules virales, nous avons déterminé la capacité des cellules épithéliales endocervicales infectées à transmettre le virus à des cellules immunitaires sous-muqueuse. Pour cela, nous avons visualisé par microscopie confocale la capacité des cellules endocervicales infectées par des virus chimériques à tropisme X4 ou R5 à transmettre l'infection, par contact direct, à des cellules immunitaires placées en basal. Nous avons observé que les virus à tropisme R5 sont efficacement transmis aux PBMC, alors que les virus à tropisme X4 ne sont transmis que de façon très peu efficace. Ces résultats montrent que les cellules épithéliales génitales endocervicales séquestrent les particules virales à tropisme X4 et favorisent le passage des virus à tropisme R5 à travers la muqueuse génitale endocervicale, jouant ainsi un rôle essentiel dans la sélection des virus à tropisme R5 lors de la transmission hétérosexuelle de HIV.

Par ailleurs, afin de déterminer à quelle étape le cycle de réplication des souches à tropisme X4 est arrêté dans les cellules endocervicales, des expériences de détection et de quantification par PCR des ARNm *tat rev* et *nef*, premiers transcrits au cours de la réplication de HIV, ainsi que de détection de protéines virales traduites dans les cellules infectées sont en cours de réalisation.

Ainsi, le virus chimérique développé et décrit dans ce manuscrit apparaît comme un outil précieux pour étudier l'infection de différentes muqueuses génitales féminines par du virus libre et du virus associé aux cellules en visualisant directement le passage des deux formes virales et leurs interactions avec les composants de la muqueuse. La visualisation de ces éléments, combinée à la segmentation mathématique que nous avons développée en collaboration avec l'ENSMSE, est susceptible de contribuer à mieux évaluer l'importance respective de chaque forme virale au cours de la transmission hétérosexuelle de HIV. De tels outils permettront par ailleurs d'évaluer l'impact de stratégies thérapeutiques curatives ou prophylactiques visant très précisément certaines étapes de la pénétration de HIV à travers les muqueuses génitales féminines.

Plusieurs jours après un rapport sexuel, le sperme peut être retrouvé dans le tractus génital féminin supérieur, notamment au niveau de la muqueuse endocervicale. Cette zone de la muqueuse génitale féminine semble donc importante dans la transmission hétérosexuelle de HIV, après contact avec le sperme contaminé [16,127,167,229]. L'épithélium endocervical est une monocouche de cellules épithéliales, sensible à l'infection par HIV, ce qui en fait un modèle d'intérêt, simple à

reproduire, pour l'étude de la transmission hétérosexuelle de HIV. Dans les études décrites dans ce manuscrit nous avons utilisé un modèle simplifié de muqueuse endocervicale [97,153,221]. Ce modèle peut être complexifié par l'ajout de cellules immunitaires ou de bactéries, afin d'étudier la transmission dans des conditions plus physiopathologiques [187]. De plus, la transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme s'effectuant également au niveau des muqueuses vaginale et exocervicale, il serait légitime d'utiliser ces outils pour modéliser le passage du virus à travers ces muqueuses [15,191].

Par ailleurs, si l'étude de la transmission sexuelle sur des modèles de muqueuse reconstruite *in vitro* est reproductible et facile à mettre en place, notamment pour des études préliminaires sur les mécanismes de la transmission de HIV (cf. article I), ou l'évaluation de nouveaux outils (cf. article II), ces modèles ne sont pas représentatifs de l'architecture générale de la muqueuse *in vivo*, ni de la complexité d'interactions entre les cellules immunitaires et épithéliales, auxquelles s'ajoute la flore microbienne constitutives de la cavité vaginale [97,185,198,199,254]. Ainsi, le virus chimérique développé ici, combiné à la segmentation mathématique décrite dans l'article II, pourrait être utilisé sur des explants de muqueuse génitale féminine, respectueux de l'architecture de la muqueuse et de son environnement afin de visualiser la traversée de cette muqueuse dans un contexte se rapprochant d'avantage de la physiopathologie humaine.

Dans l'organisme, il existe différents compartiments anatomiques ; la distinction entre le compartiment sanguin et le compartiment séminal est bien établie par la présence d'une quasi-espèce virale constituée de souches différentes entre ces deux compartiments [108,155,157]. Les souches diffèrent notamment au niveau de leur protéine d'enveloppe gp160, ce qui suggère des interactions potentiellement différentes avec les cellules de la muqueuse génitale féminine [139,155,159,161,263,264]. C'est pourquoi il apparaît pertinent d'étudier la transmission hétérosexuelle de HIV à l'aide de particules virales d'origine séminale. Devant les difficultés techniques rencontrées pour cultiver des virus issus de prélèvements de sperme de patients infectés, nous envisageons de développer, en collaboration avec l'IMT d'Anvers, des virus chimériques tel que ceux décrits dans l'article II, porteurs d'une enveloppe d'origine séminale à tropisme X4 ou R5, amplifiée par PCR à partir de prélèvements de sperme de patients séropositifs. Ces nouveaux outils permettront d'affiner le modèle en le rapprochant encore des conditions physiopathologiques observées *in vivo*.

Lors d'un rapport sexuel le sperme, contenant le virus libre ou associé aux cellules, entre au contact de la muqueuse génitale féminine. Nous avons montré dans l'article I que le plasma séminal augmente la résistance *trans*-épithéliale de la muqueuse endocervicale [259]. Ce rôle du plasma

séminal dans la transmission sexuelle de HIV a été bien souligné par ailleurs [16,191,198,199,207–211,259]. Aussi, il serait important à l’avenir de prendre en compte ce paramètre dans les nouveaux modèles évoqués dans les paragraphes précédents afin de visualiser de façon plus pertinente la traversée par HIV des muqueuses génitales féminines.

Enfin, suite à une contamination hétérosexuelle, l’établissement de l’infection systémique est dû à la migration de cellules immunitaires présentes dans la muqueuse, vers les ganglions lymphatiques [15]. Les expériences de transmission rapportées ici ont utilisé une population totale de cellules mononucléées sanguines. Afin d’étudier plus finement l’implication de chaque population cellulaire dans la transmission et la mise en place d’une infection systémique, il est prévu, au sein du laboratoire, de refaire ces expériences de transmission après avoir séparé chaque type cellulaire contenu dans les PBMC. Ces expériences permettront de déterminer précisément quelles cellules immunitaires sont préférentiellement impliquées dans la dissémination de l’infection dans tout l’organisme.

La transmission hétérosexuelle de HIV est étudiée depuis de nombreuses années, et même si les connaissances dans ce domaine avancent, beaucoup de questions restent en suspens à l’heure actuelle. Dans ce travail nous apportons des réponses quant aux mécanismes régissant ce phénomène et aux interactions complexes intervenant entre les différents acteurs de la contamination par voie sexuelle : virus, muqueuse génitale féminine et sperme. De plus, nous décrivons un virus chimérique et une technique d’analyse qui permettront, par visualisation directe de la contamination, de décrire plus précisément les mécanismes de passage de HIV à travers la muqueuse génitale féminine et l’établissement de l’infection systémique, ainsi que la sélection de virus à tropisme R5. La meilleure compréhension de la transmission de HIV par voie hétérosexuelle devrait faciliter dans un proche avenir le développement de stratégies vaccinales et microbicides. Après des améliorations et une complexification qu’il n’a pas été possible d’aborder dans ce travail de thèse, le modèle décrit ici, du fait de sa capacité à visualiser directement et de façon relativement standardisée la traversée de la muqueuse par le virus, représentera un excellent outil pour tester leur efficacité.

# ANNEXES

# Participation aux activités de recherche du laboratoire

## **Residual HIV-1 cell-associated DNA in semen of long-term HAART-experienced men is not reactivated under inflammatory environment**

Amandine Gagneux-Brunon<sup>1,2</sup>, Dorsaf Nasri<sup>1\*</sup>, Rachel Terrasse<sup>1\*</sup>, Karine Sauné<sup>3</sup>, Marie-Claude Gagnieu<sup>4</sup>, Anne Frésard<sup>2</sup>, Olivier Delezay<sup>1</sup>, Jacques Izopet<sup>3</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1</sup>, Frédéric Lucht<sup>2</sup>, Thomas Bourlet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Virology; GIMAP EA3064, University Hospital of Saint-Etienne, France ; <sup>2</sup> Department of Infectious Diseases, GIMAP EA3064, University Hospital of Saint-Etienne, France ; <sup>3</sup> **LABO XXXXXX** ;

<sup>4</sup> Laboratory of Pharmacology and Toxicology, University Hospital of Lyon, France.

\* both authors participate equally to the work

*Article en preparation.*

**Objectives.** The semen of HIV-1 infected-men contains free-particles (RNA) and proviral-DNA integrated into non spermatozoa mononuclear cells (NSMC), both potentially transmitted by sexual route. Our study aims to assess the efficacy of HAART on HIV-1 RNA and proviral DNA in the semen of long-term treated-men and to study the potential role of inflammation on the cell-associated HIV-1 replication. **Methods.** Forty-five paired-samples of semen and blood were obtained from 41 consenting-men, 10 untreated and 31 under HAART. RNA viral and DNA proviral loads were quantified in blood and seminal plasma by Abbott Real-time m2000rt assay and in PBMC and NSMC



fractions by an in-house Real-Time PCR test, respectively. *Tat/rev/nef* intra-cellular mRNA was detected by RT-PCR. A total of 27 cytokines/chemokines were quantified in 20 paired-samples by Bio-plex<sup>TM</sup> assay. NSMCs from 3 treated-patients, positive for proviral DNA, were cultured for 7 days, with or without IL1- $\beta$  (100 pg/ml). **Results.** RNA viral loads in blood and semen were significantly different between naïve- and treated-patients (*P* values of 0.011 and 0.005, respectively). Conversely, no significant differences were observed between treated and untreated men for HIV-1 DNA loads, *tat* mRNA detection and intra-cellular HIV-1 RNA in PBMC and in NSMC. None of the cytokines/chemokines tested was correlated with the presence of HIV-1 RNA or DNA in blood and semen samples. Moreover, none of the 3 HIV-1 DNA positive NSMCs fractions cultured 7 days (with or without IL1- $\beta$ ) was positive for HIV-1 RNA production.

**Conclusions.** Our results confirm the efficacy of HAART on the reduction of RNA HIV-1 load in semen but suggest the inability of HAART to cure HIV-1 DNA in NSMC. Interestingly, this residual cell-associated virus was not replicating under inflammation conditions. At the era of “Treatment as Prevention”, our data contribute to a better knowledge of sexual transmission risks in HAART experienced patients.

# Communications orales et affichées

## Communications orales :

- **Visualisation et Modélisation du Passage du VIH-1 d'Origine Séminale à Travers la Muqueuse Génitale Féminine.**

Rachel TERRASSE, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *Journée du cluster 10 infectiologie - 2012 – Lyon, France*

- **Etude *in vitro* du franchissement *trans*-épithélial de HIV-1 à travers la muqueuse génitale féminine. Rôle des cellules épithéliales génitales dans la sélection à tropisme R5.**

Rachel TERRASSE, Olivier Delezay, Thomas Olivier, Sabine Palle, Jean Charles Pinoli, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *6<sup>ème</sup> conférence Francophone VIH/SIDA - AFRAVIH - 2012 – Genève, Suisse.*

## Posters :

- **Construction d'un virus HIV-1 chimérique d'origine séminale permettant de visualiser le passage *trans*-épithélial lors d'une transmission hétérosexuelle.**

Rachel Terrasse, Dorsaf Nasri, Amandine Brunon, Hénia Saoudin, Hind Hamzeh-Cognasse, Olivier Delezay, Jean Charles Pinoli, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet

- *Journée de l'IFRESIS - 2010 – Saint-Etienne, France.*
- *Journée du cluster 10 infectiologie - 2010 – Lyon, France*
- *Journée de la recherche de l'ED 488 SIS - 2011 – Saint-Etienne, France.*

- Etude *in vitro* du franchissement *trans*-épithélial du VIH-1 à travers la muqueuse génitale féminine.

Rachel Terrasse, Amandine Brunon, Dorsaf Nasri, Hind Hamzeh-Cognasse, Olivier Delezay, Thomas Olivier, Jean Charles Pinoli, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *Journée de l'IFRESIS 2010 – Saint-Etienne, France.*
- *Université des Jeunes Chercheurs (UJC) – Sidaction et AIDES – 2011 – Carry-Le-Rouet, France.*

- Etude *in vitro* du franchissement *trans*-épithélial du VIH-1 à travers la muqueuse génitale féminine.

Rachel Terrasse, Leo Heyndrickx, Olivier Delezay, Thomas Olivier, Sabine Palle, Jean Charles Pinoli, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *6<sup>ème</sup> conférence Francophone VIH/SIDA - AFRAVIH - 2012 – Genève, Suisse.*

- *In vitro* study and visualization of female genital epithelial endocervical infection by HIV-1. Role of epithelial cells in the R5 tropism selection.

Rachel Terrasse, Leo Heyndrickx, Olivier Delezay, Thomas Olivier, Sabine Palle, Yann Gavet, Jean Charles Pinoli, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *International Symposium HIV & Emerging Infectious Diseases - 2012 – Marseille, France.*

- Etude *in vitro* du franchissement *trans*-épithélial de HIV-1 à travers la muqueuse génitale féminine. Rôle des cellules épithéliales dans la sélection à tropisme R5.

Rachel Terrasse, Leo Heyndrickx, Olivier Delezay, Thomas Olivier, Sabine Palle, Jean Charles Pinoli, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *Journée de la recherche de l'ED 488 SIS - 2012 – Saint-Etienne, France.*

**Activités de vulgarisation scientifique :**

- **Communication orale : Visualisation et Modélisation du Passage du VIH-1 d'Origine Séminale à Travers la Muqueuse Génitale Féminine.**

Rachel TERRASSE, Bruno Pozzetto, Thomas Bourlet.

- *Séminaire satellite du congrès international AIDS – 2010 - NowAIDS – Lyon, France.*

- **Poster : Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : VIH/SIDA**

Aurore FLEURIE\*, Rachel TERRASSE\*.

- *Journée de la fête de la science – 2011 – Lyon, France*

# REFERENCES

- [1] K.M. De Cock, H.W. Jaffe, J.W. Curran, Reflections on 30 years of AIDS, *Emerging Infect. Dis.* 17 (2011) 1044–1048.
- [2] F. Barré-Sinoussi, J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, et al., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*. 220 (1983) 868–871.
- [3] F. Clavel, D. Guétard, F. Brun-Vézinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos-Ferreira, et al., Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science*. 233 (1986) 343–346.
- [4] M. Popovic, M.G. Sarngadharan, E. Read, R.C. Gallo, Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS, *Science*. 224 (1984) 497–500.
- [5] J.A. Levy, A.D. Hoffman, S.M. Kramer, J.A. Landis, J.M. Shimabukuro, L.S. Oshiro, Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS, *Science*. 225 (1984) 840–842.
- [6] J. Coffin, A. Haase, J.A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, et al., What to call the AIDS virus?, *Nature*. 321 (1986) 10.
- [7] G. Biberfeld, F. Brown, J. Esparza, M. Essex, R.C. Gallo, L. Montagnier, et al., WHO Working Group on Characterization of HIV-Related Retroviruses: criteria for characterization and proposal for a nomenclature system, *AIDS*. 1 (1987) 189–190.
- [8] A.S. Fauci, 25 years of HIV, *Nature*. 453 (2008) 289–290.
- [9] A. Le Tortorec, N. Dejucq-Rainsford, [Infection of semen-producing organs by HIV and role in virus dissemination], *Med Sci (Paris)*. 26 (2010) 861–868.
- [10] UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010., (2010).
- [11] P.H. Kilmarx, Global epidemiology of HIV, *Curr Opin HIV AIDS*. 4 (2009) 240–246.
- [12] CDC - MMWR - MMWR Publications - MMWR Weekly: Past Volume (1982), (n.d.).
- [13] Y. Furuta, K. Eriksson, B. Svennerholm, P. Fredman, P. Horal, S. Jeansson, et al., Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 12559–12563.
- [14] J. Münch, E. Rücker, L. Ständker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, et al., Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection, *Cell*. 131 (2007) 1059–1071.
- [15] F. Hladik, M.J. McElrath, Setting the stage: host invasion by HIV, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 447–457.
- [16] P.J. Southern, J.E. Horbul, B.R.L. Miller, D.M. Maher, Coming of age: reconstruction of heterosexual HIV-1 transmission in human ex vivo organ culture systems, *Mucosal Immunol.* 4 (2011) 383–396.
- [17] N.S. Padian, S.C. Shiboski, S.O. Glass, E. Vittinghoff, Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV) in northern California: results from a ten-year study, *Am. J. Epidemiol.* 146 (1997) 350–357.
- [18] B. Avert, D. Taljaard, E. Lagarde, J. Sobngwi-Tambekou, R. Sitta, A. Puren, Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial, *PLoS Med.* 2 (2005) e298.
- [19] T. Quinn, Circumcision and HIV transmission. [Curr Opin Infect Dis. 2007] - PubMed - NCBI, (2007).
- [20] G. Pantaleo, C. Graziosi, A.S. Fauci, New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 327–335.
- [21] D.R. Henrard, J.F. Phillips, L.R. Muenz, W.A. Blattner, D. Wiesner, M.E. Eyster, et al., Natural History of HIV-1 Cell-Free Viremia, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 274 (1995) 554–558.
- [22] S. Cowley, The biology of HIV infection, *Lepr Rev.* 72 (2001) 212–220.
- [23] P. Corbeau, J. Reynes, Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection, *Blood*. 117 (2011) 5582–5590.

- [24] Animal models for HIV infection and AIDS: memorandum from a WHO meeting, *Bull. World Health Organ.* 66 (1988) 561–574.
- [25] M.B. Gardner, P.A. Luciw, Animal models of AIDS, *FASEB J.* 3 (1989) 2593–2606.
- [26] B.G. Turner, M.F. Summers, Structural biology of HIV, *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 1–32.
- [27] J.-I. Sakuragi, Morphogenesis of the Infectious HIV-1 Virion, *Front Microbiol.* 2 (2011) 242.
- [28] A.D. Frankel, J.A. Young, HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 1–25.
- [29] E. Le Rouzic, S. Benichou, The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle, *Retrovirology.* 2 (2005) 11.
- [30] B.R. Cullen, Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways, *Virology.* 249 (1998) 203–210.
- [31] E.O. Freed, HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle, *Virology.* 251 (1998) 1–15.
- [32] J.A.G. Briggs, H.-G. Kräusslich, The molecular architecture of HIV, *J. Mol. Biol.* 410 (2011) 491–500.
- [33] K.C. Klein, J.C. Reed, J.R. Lingappa, Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag, *AIDS Rev.* 9 (2007) 150–161.
- [34] S. Popov, M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M.A. Lee, L. Ratner, et al., Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex, *EMBO J.* 17 (1998) 909–917.
- [35] B. Van Maele, Z. Debyser, HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins, *AIDS Rev.* 7 (2005) 26–43.
- [36] B.K. Ganser-Pornillos, M. Yeager, W.I. Sundquist, The structural biology of HIV assembly, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 203–217.
- [37] A. Ono, E.O. Freed, Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body, *J. Virol.* 78 (2004) 1552–1563.
- [38] W. Paxton, R.I. Connor, N.R. Landau, Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis, *J. Virol.* 67 (1993) 7229–7237.
- [39] K. Wiegers, G. Rutter, H. Kottler, U. Tessmer, H. Hohenberg, H.G. Kräusslich, Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites, *J. Virol.* 72 (1998) 2846–2854.
- [40] B.M. Peterlin, D. Trono, Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 97–107.
- [41] P.J. Klasse, The molecular basis of HIV entry, *Cellular Microbiology.* (2012).
- [42] R. Geleziunas, S. Bour, M.A. Wainberg, Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1, *FASEB J.* 8 (1994) 593–600.
- [43] R.L. Willey, E.K. Ross, A.J. Buckler-White, T.S. Theodore, M.A. Martin, Functional interaction of constant and variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120, *J. Virol.* 63 (1989) 3595–3600.
- [44] L.Q. Zhang, P. MacKenzie, A. Cleland, E.C. Holmes, A.J. Brown, P. Simmonds, Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection, *J. Virol.* 67 (1993) 3345–3356.
- [45] E.A. Berger, And the best picture is--the HIV gp120 envelope, please!, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 671–674.
- [46] D.G. Nguyen, J.E.K. Hildreth, Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 483–493.
- [47] L. Stamatatos, C. Cheng-Mayer, Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range, and syncytium-forming ability, *J. Virol.* 67 (1993) 5635–5639.
- [48] P.D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski, W.A. Hendrickson, Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature.* 393 (1998) 648–659.



- [49] N.G. Hoffman, F. Seillier-Moiseiwitsch, J. Ahn, J.M. Walker, R. Swanstrom, Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop, *J. Virol.* 76 (2002) 3852–3864.
- [50] M. Saifuddin, M.L. Hart, H. Gewurz, Y. Zhang, G.T. Spear, Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1, *J. Gen. Virol.* 81 (2000) 949–955.
- [51] K.H. Roux, K.A. Taylor, AIDS virus envelope spike structure, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 244–252.
- [52] S. Debaisieux, F. Rayne, H. Yezid, B. Beaumelle, The ins and outs of HIV-1 Tat, *Traffic*. 13 (2012) 355–363.
- [53] Y. Wu, HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA, *Retrovirology*. 1 (2004) 13.
- [54] J. Münch, D. Rajan, M. Schindler, A. Specht, E. Rücker, F.J. Novembre, et al., Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses, *J. Virol.* 81 (2007) 13852–13864.
- [55] M. Khan, M. Garcia-Barrio, M.D. Powell, Restoration of wild-type infectivity to human immunodeficiency virus type 1 strains lacking nef by intravirion reverse transcription, *J. Virol.* 75 (2001) 12081–12087.
- [56] S. Nisole, A. Saïb, Early steps of retrovirus replicative cycle, *Retrovirology*. 1 (2004) 9.
- [57] J.V. Fritz, D. Dujardin, J. Godet, P. Didier, J. De Mey, J.-L. Darlix, et al., HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between Vpr and Gag, *J. Virol.* 84 (2010) 1585–1596.
- [58] M.E. Rogel, L.I. Wu, M. Emerman, The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection, *J. Virol.* 69 (1995) 882–888.
- [59] M. Dubé, M.G. Bego, C. Paquay, É.A. Cohen, Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein, *Retrovirology*. 7 (2010) 114.
- [60] M. Nakai, T. Goto, Ultrastructure and morphogenesis of human immunodeficiency virus, *J Electron Microsc (Tokyo)*. 45 (1996) 247–257.
- [61] D. McDonald, M.A. Vodicka, G. Lucero, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, M. Emerman, et al., Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells, *J. Cell Biol.* 159 (2002) 441–452.
- [62] A.R.W. Schröder, P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J.R. Ecker, F. Bushman, HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots, *Cell*. 110 (2002) 521–529.
- [63] N.M. Sherer, M.J. Lehmann, L.F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S.M. Horner, G. Cicchetti, et al., Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies, *Traffic*. 4 (2003) 785–801.
- [64] N. Jouvenet, S.J.D. Neil, C. Bess, M.C. Johnson, C.A. Virgen, S.M. Simon, et al., Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly, *PLoS Biol.* 4 (2006) e435.
- [65] V. Baumgärtel, B. Müller, D.C. Lamb, Quantitative Live-Cell Imaging of Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) Assembly, *Viruses*. 4 (2012) 777–799.
- [66] D.L. Robertson, J.P. Anderson, J.A. Bradac, J.K. Carr, B. Foley, R.K. Funkhouser, et al., HIV-1 nomenclature proposal, *Science*. 288 (2000) 55–56.
- [67] P. Charneau, A.M. Borman, C. Quillent, D. Guétard, S. Chamaret, J. Cohen, et al., Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group, *Virology*. 205 (1994) 247–253.
- [68] R. De Leys, B. Vanderborght, M. Vanden Haesevelde, L. Heyndrickx, A. van Geel, C. Wauters, et al., Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin, *J. Virol.* 64 (1990) 1207–1216.
- [69] F. Simon, P. Maucière, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M.C. Müller-Trutwin, S. Saragosti, et al., Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O, *Nat. Med.* 4 (1998) 1032–1037.
- [70] F. Brun-Vézinet, F. Damond, F. Simon, [Variability of human immunodeficiency virus type 1], *Bull Soc Pathol Exot.* 92 (1999) 261–263.

- [71] J.-C. Plantier, M. Leoz, J.E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemée, et al., A new human immunodeficiency virus derived from gorillas, *Nat. Med.* 15 (2009) 871–872.
- [72] A. Vallari, V. Holzmayer, B. Harris, J. Yamaguchi, C. Ngansop, F. Makamche, et al., Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon, *J. Virol.* 85 (2011) 1403–1407.
- [73] K.J. Liner 2nd, C.D. Hall, K.R. Robertson, Impact of human immunodeficiency virus (HIV) subtypes on HIV-associated neurological disease, *J. Neurovirol.* 13 (2007) 291–304.
- [74] I.F. Butler, I. Pandrea, P.A. Marx, C. Apetrei, HIV genetic diversity: biological and public health consequences, *Curr. HIV Res.* 5 (2007) 23–45.
- [75] M.E. Quiñones-Mateu, E.J. Arts, Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299 (2006) 83–140.
- [76] A.G. Dalgleish, P.C. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves, R.A. Weiss, The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature*. 312 (1984) 763–767.
- [77] D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, et al., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV, *Nature*. 312 (1984) 767–768.
- [78] L. Zhang, T. He, A. Talal, G. Wang, S.S. Frankel, D.D. Ho, In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5, *J. Virol.* 72 (1998) 5035–5045.
- [79] Y. Feng, C.C. Broder, P.E. Kennedy, E.A. Berger, HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, *Science*. 272 (1996) 872–877.
- [80] E.A. Berger, P.M. Murphy, J.M. Farber, Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease, *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 657–700.
- [81] C.C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, et al., The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry, *Nature*. 382 (1996) 829–833.
- [82] E. Oberlin, A. Amara, F. Bachelierie, C. Bessia, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, et al., The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1, *Nature*. 382 (1996) 833–835.
- [83] N.I. Tarasova, R.H. Stauber, C.J. Michejda, Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15883–15886.
- [84] J.P. Moore, A. Trkola, T. Dragic, Co-receptors for HIV-1 entry, *Curr. Opin. Immunol.* 9 (1997) 551–562.
- [85] T.B. Geijtenbeek, D.S. Kwon, R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, J. Middel, et al., DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells, *Cell*. 100 (2000) 587–597.
- [86] F. Cocchi, A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo, P. Lusso, Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells, *Science*. 270 (1995) 1811–1815.
- [87] N. Signoret, A. Pelchen-Matthews, M. Mack, A.E. Proudfoot, M. Marsh, Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 1281–1294.
- [88] W.A. Paxton, S.R. Martin, D. Tse, T.R. O'Brien, J. Skurnick, N.L. VanDevanter, et al., Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure, *Nat. Med.* 2 (1996) 412–417.
- [89] M. Dean, M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley, M.W. Smith, R. Allikmets, et al., Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study, *Science*. 273 (1996) 1856–1862.
- [90] J.-C. Grivel, R.J. Shattock, L.B. Margolis, Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper?, *J Transl Med.* 9 Suppl 1 (2011) S6.
- [91] L. Bélec, *Transmission sexuelle de l'infection par le VIH*, John Libbey Eurotext, 2007.

- [92] K. Ikeuchi, S. Kim, R.A. Byrn, S.R. Goldring, J.E. Groopman, Infection of nonlymphoid cells by human immunodeficiency virus type 1 or type 2, *J. Virol.* 64 (1990) 4226–4231.
- [93] A. Alfsen, M. Bomsel, HIV-1 gp41 envelope residues 650–685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25649–25659.
- [94] O. Delézay, N. Koch, N. Yah, D. Hammache, C. Tourres, C. Tamalet, et al., Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29, *AIDS*. 11 (1997) 1311–1318.
- [95] G.R. Yeaman, S. Asin, S. Weldon, D.J. Demian, J.E. Collins, J.L. Gonzalez, et al., Chemokine receptor expression in the human ectocervix: implications for infection by the human immunodeficiency virus-type I, *Immunology*. 113 (2004) 524–533.
- [96] M.D. Bobardt, U. Chatterji, S. Selvarajah, B. Van der Schueren, G. David, B. Kahn, et al., Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells, *J. Virol.* 81 (2007) 395–405.
- [97] H. Saïdi, G. Magri, N. Nasreddine, M. Réquena, L. Bélec, R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission, *Virology*. 358 (2007) 55–68.
- [98] H. Slimani, N. Charnaux, E. Mbemba, L. Saffar, R. Vassy, C. Vita, et al., Binding of the CC-chemokine RANTES to syndecan-1 and syndecan-4 expressed on HeLa cells, *Glycobiology*. 13 (2003) 623–634.
- [99] P. Gallay, Syndecans and HIV-1 pathogenesis, *Microbes Infect.* 6 (2004) 617–622.
- [100] A.C. Saphire, M.D. Bobardt, Z. Zhang, G. David, P.A. Gallay, Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages, *J. Virol.* 75 (2001) 9187–9200.
- [101] E. Stoddard, G. Cannon, H. Ni, K. Karikó, J. Capodici, D. Malamud, et al., gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission, *J. Immunol.* 179 (2007) 3126–3132.
- [102] S. Pöhlmann, F. Baribaud, R.W. Doms, DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV, *Trends Immunol.* 22 (2001) 643–646.
- [103] R.D. Wiley, S. Gummuluru, Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 738–743.
- [104] L. de Witte, A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M.A.W.P. de Jong, T. de Gruijl, et al., Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells, *Nat. Med.* 13 (2007) 367–371.
- [105] L. Wu, Biology of HIV mucosal transmission, *Curr Opin HIV AIDS*. 3 (2008) 534–540.
- [106] E.L. Johansson, A. Rudin, L. Wassén, J. Holmgren, Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina, *Immunology*. 96 (1999) 272–277.
- [107] D. Maher, X. Wu, T. Schacker, J. Horbul, P. Southern, HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 11504–11509.
- [108] S.G. Deeks, B. Autran, B. Berkhout, M. Benkirane, S. Cairns, N. Chomont, et al., Towards an HIV cure: a global scientific strategy, *Nature Reviews. Immunology*. 12 (2012) 607–614.
- [109] C.J. Miller, R.J. Shattock, Target cells in vaginal HIV transmission, *Microbes Infect.* 5 (2003) 59–67.
- [110] Q. Hu, I. Frank, V. Williams, J.J. Santos, P. Watts, G.E. Griffin, et al., Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 1065–1075.
- [111] D. McDonald, L. Wu, S. Bohks, V. KewalRamani, D. Unutmaz, T. Hope, Recruitment of HIV and its receptors to dendritic ce... [Science. 2003] - PubMed - NCBI, (2003).
- [112] L. Burleigh, P.-Y. Lozach, C. Schiffer, I. Staropoli, V. Pezo, F. Porrot, et al., Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells, *J. Virol.* 80 (2006) 2949–2957.
- [113] F. Hladik, P. Sakchalathorn, L. Ballweber, G. Lentz, M. Fialkow, D. Eschenbach, et al., Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1, *Immunity*. 26 (2007) 257–270.

- [114] D.L. Tuttle, J.K. Harrison, C. Anders, J.W. Sleasman, M.M. Goodenow, Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 72 (1998) 4962–4969.
- [115] P. Greenhead, P. Hayes, P.S. Watts, K.G. Laing, G.E. Griffin, R.J. Shattock, Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides, *J. Virol.* 74 (2000) 5577–5586.
- [116] H. Saïdi, G. Magri, C. Carbonneil, H. Bouhlal, H. Hocini, L. Belec, Apical interactions of HIV type 1 with polarized HEC-1 cell monolayer modulate R5-HIV type 1 spread by submucosal macrophages, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 25 (2009) 497–509.
- [117] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, F. Cognasse, Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways, *Br. J. Haematol.* 151 (2010) 89–92.
- [118] K.J. Clemetson, Platelets and pathogens, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 495–498.
- [119] O. Garraud, J. Berthet, H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets, *Thromb. Res.* 127 (2011) 283–286.
- [120] F. Cognasse, H. Hamzeh-Cognasse, J. Berthet, P. Damien, F. Lucht, B. Pozzetto, et al., Altered release of regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted protein from human, normal platelets: contribution of distinct HIV-1MN gp41 peptides, *AIDS.* 23 (2009) 2057–2059.
- [121] T. Weissmüller, E.L. Campbell, P. Rosenberger, M. Scully, P.L. Beck, G.T. Furuta, et al., PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 3682–3692.
- [122] J. Pudney, A.J. Quayle, D.J. Anderson, Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 1253–1263.
- [123] M. Sips, G. Sciaranghella, T. Diefenbach, A.-S. Dugast, C.T. Berger, Q. Liu, et al., Altered distribution of mucosal NK cells during HIV infection, *Mucosal Immunology.* 5 (2011) 30–40.
- [124] G. Rappocciolo, P. Piazza, C.L. Fuller, T.A. Reinhart, S.C. Watkins, D.T. Rowe, et al., DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes, *PLoS Pathog.* 2 (2006) e70.
- [125] E.A. Berger, R.W. Doms, E.M. Fenyo, B.T. Korber, D.R. Littman, J.P. Moore, et al., A new classification for HIV-1, *Nature.* 391 (1998) 240.
- [126] G. Alkhatib, C.C. Broder, E.A. Berger, Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages, *J. Virol.* 70 (1996) 5487–5494.
- [127] L. Margolis, R. Shattock, Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved?, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 312–317.
- [128] A. Carrillo, L. Ratner, Human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-lymphoid cell lines: role of the V3 loop and C4 envelope determinants, *J. Virol.* 70 (1996) 1301–1309.
- [129] G.J. LaRosa, J.P. Davide, K. Weinhold, J.A. Waterbury, A.T. Profy, J.A. Lewis, et al., Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant, *Science.* 249 (1990) 932–935.
- [130] Y. Takeuchi, M. Akutsu, K. Murayama, N. Shimizu, H. Hoshino, Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene, *J. Virol.* 65 (1991) 1710–1718.
- [131] W.A. O’Brien, Y. Koyanagi, A. Namazie, J.Q. Zhao, A. Diagne, K. Idler, et al., HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain, *Nature.* 348 (1990) 69–73.
- [132] S.S. Hwang, T.J. Boyle, H.K. Lyster, B.R. Cullen, Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1, *Science.* 253 (1991) 71–74.
- [133] T. Shioda, J.A. Levy, C. Cheng-Mayer, Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene, *Nature.* 349 (1991) 167–169.

- [134] J.J. de Jong, J. Goudsmit, W. Keulen, B. Klaver, W. Krone, M. Tersmette, et al., Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity, *J. Virol.* 66 (1992) 757–765.
- [135] R.A. Fouchier, M. Groenink, N.A. Kootstra, M. Tersmette, H.G. Huisman, F. Miedema, et al., Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule, *J. Virol.* 66 (1992) 3183–3187.
- [136] M. Sharon, N. Kessler, R. Levy, S. Zolla-Pazner, M. Görlach, J. Anglister, Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity, *Structure.* 11 (2003) 225–236.
- [137] G. Pollakis, S. Kang, A. Kliphuis, M.I. Chalaby, J. Goudsmit, W.A. Paxton, N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13433–13441.
- [138] G.J. Gram, A. Hemming, A. Bolmstedt, B. Jansson, S. Olofsson, L. Akerblom, et al., Identification of an N-linked glycan in the V1-loop of HIV-1 gp120 influencing neutralization by anti-V3 antibodies and soluble CD4, *Arch. Virol.* 139 (1994) 253–261.
- [139] T. Zhu, N. Wang, A. Carr, D.S. Nam, R. Moor-Jankowski, D.A. Cooper, et al., Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission, *J. Virol.* 70 (1996) 3098–3107.
- [140] Z. Yang, B.K. Chakrabarti, L. Xu, B. Welcher, W. Kong, K. Leung, et al., Selective modification of variable loops alters tropism and enhances immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 envelope, *J. Virol.* 78 (2004) 4029–4036.
- [141] M.T. Boyd, G.R. Simpson, A.J. Cann, M.A. Johnson, R.A. Weiss, A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism, *J. Virol.* 67 (1993) 3649–3652.
- [142] M. Groenink, R.A. Fouchier, S. Broersen, C.H. Baker, M. Koot, A.B. van't Wout, et al., Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration, *Science.* 260 (1993) 1513–1516.
- [143] P. Westervelt, D.B. Trowbridge, L.G. Epstein, B.M. Blumberg, Y. Li, B.H. Hahn, et al., Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 in vivo, *J. Virol.* 66 (1992) 2577–2582.
- [144] K. Fujita, J. Silver, K. Peden, Changes in both gp120 and gp41 can account for increased growth potential and expanded host range of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 66 (1992) 4445–4451.
- [145] M. Kowalski, L. Bergeron, T. Dorfman, W. Haseltine, J. Sodroski, Attenuation of human immunodeficiency virus type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein, *J. Virol.* 65 (1991) 281–291.
- [146] L. Bergeron, N. Sullivan, J. Sodroski, Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus, *J. Virol.* 66 (1992) 2389–2397.
- [147] T.F. Wolfs, G. Zwart, M. Bakker, J. Goudsmit, HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission, *Virology.* 189 (1992) 103–110.
- [148] T. Zhu, H. Mo, N. Wang, D.S. Nam, Y. Cao, R.A. Koup, et al., Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection, *Science.* 261 (1993) 1179–1181.
- [149] A.B. van't Wout, N.A. Kootstra, G.A. Mulder-Kampinga, N. Albrecht-van Lent, H.J. Scherpbier, J. Veenstra, et al., Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 2060–2067.
- [150] A.D. Kashuba, J.R. Dyer, L.M. Kramer, R.H. Raasch, J.J. Eron, M.S. Cohen, Antiretroviral-drug concentrations in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1817–1826.

- [151] A. Le Tortorec, A.-P. Satie, H. Denis, N. Rioux-Leclercq, L. Havard, A. Ruffault, et al., Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains ex vivo, *Retrovirology*. 5 (2008) 119.
- [152] W.W. Agace, A. Amara, A.I. Roberts, J.L. Pablos, S. Thelen, M. Uguccioni, et al., Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation, *Curr. Biol.* 10 (2000) 325–328.
- [153] W. Berlier, T. Bourlet, P. Lawrence, H. Hamzeh, C. Lambert, C. Genin, et al., Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV, *J. Med. Virol.* 77 (2005) 465–474.
- [154] P.D. Kwong, R. Wyatt, Q.J. Sattentau, J. Sodroski, W.A. Hendrickson, Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus, *J. Virol.* 74 (2000) 1961–1972.
- [155] B.T. Korber, K.J. Kunstman, B.K. Patterson, M. Furtado, M.M. McEvilly, R. Levy, et al., Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences, *J. Virol.* 68 (1994) 7467–7481.
- [156] E.L. Delwart, J.I. Mullins, P. Gupta, G.H. Learn Jr, M. Holodniy, D. Katzenstein, et al., Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen, *J. Virol.* 72 (1998) 617–623.
- [157] A. Le Tortorec, N. Dejucq-Rainsford, HIV infection of the male genital tract--consequences for sexual transmission and reproduction, *Int. J. Androl.* 33 (2010) e98–108.
- [158] R.A. Byrn, D. Zhang, R. Eyre, K. McGowan, A.A. Kiessling, HIV-1 in semen: an isolated virus reservoir, *Lancet*. 350 (1997) 1141.
- [159] G. Milman, O. Sharma, Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 10 (1994) 1305–1312.
- [160] K.L. Kroodsma, M.J. Kozal, K.A. Hamed, M.A. Winters, T.C. Merigan, Detection of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pol gene: differences in semen and blood HIV-1 RNA and proviral DNA, *J. Infect. Dis.* 170 (1994) 1292–1295.
- [161] P. Gupta, C. Leroux, B.K. Patterson, L. Kingsley, C. Rinaldo, M. Ding, et al., Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen, *J. Infect. Dis.* 182 (2000) 79–87.
- [162] J.A. Politch, K.H. Mayer, S.L. Welles, W.X. O'Brien, C. Xu, F.P. Bowman, et al., Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men, *AIDS*. 26 (2012) 1535–1543.
- [163] A. Tachet, E. Dulioust, D. Salmon, M. De Almeida, S. Rivalland, L. Finkielsztejn, et al., Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission, *AIDS*. 13 (1999) 823–831.
- [164] V. Roulet, A.-P. Satie, A. Ruffault, A. Le Tortorec, H. Denis, O. Guist'hau, et al., Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro, *Am. J. Pathol.* 169 (2006) 2094–2103.
- [165] A. Le Tortorec, N. Dejucq-Rainsford, [The male genital tract: A host for HIV], *Gynecol Obstet Fertil.* 35 (2007) 1245–1250.
- [166] J.M. Brenchley, D.C. Douek, HIV infection and the gastrointestinal immune system, *Mucosal Immunol.* 1 (2008) 23–30.
- [167] B.L. Shacklett, R.M. Greenblatt, Immune responses to HIV in the female reproductive tract, immunologic parallels with the gastrointestinal tract, and research implications, *Am. J. Reprod. Immunol.* 65 (2011) 230–241.
- [168] M. Mavigner, M. Cazabat, M. Dubois, F.-E. L'Faqihi, M. Requena, C. Pasquier, et al., Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 62–69.

- [169] C.S. Dezzutti, P.C. Guenther, J.E. Cummins Jr, T. Cabrera, J.H. Marshall, A. Dillberger, et al., Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1, *J. Infect. Dis.* 183 (2001) 1204–1213.
- [170] Z. Wu, Z. Chen, D.M. Phillips, Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 1473–1482.
- [171] M.S. Cohen, C.L. Gay, Treatment to prevent transmission of HIV-1, *Clin. Infect. Dis.* 50 Suppl 3 (2010) S85–95.
- [172] J.M. Baeten, E. Kahle, J.R. Lingappa, R.W. Coombs, S. Delany-Moretlwe, E. Nakku-Joloba, et al., Genital HIV-1 RNA predicts risk of heterosexual HIV-1 transmission, *Sci Transl Med.* 3 (2011) 77ra29.
- [173] D. Donnell, J.M. Baeten, J. Kiarie, K.K. Thomas, W. Stevens, C.R. Cohen, et al., Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis, *Lancet.* 375 (2010) 2092–2098.
- [174] S.J. Reynolds, F. Makumbi, G. Nakigozi, J. Kagaayi, R.H. Gray, M. Wawer, et al., HIV-1 transmission among HIV-1 discordant couples before and after the introduction of antiretroviral therapy, *AIDS.* 25 (2011) 473–477.
- [175] S. Attia, M. Egger, M. Müller, M. Zwahlen, N. Low, Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis, *AIDS.* 23 (2009) 1397–1404.
- [176] M.S. Cohen, Y.Q. Chen, M. McCauley, T. Gamble, M.C. Hosseinipour, N. Kumarasamy, et al., Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 493–505.
- [177] P. Vernazza, B. Hirschel, E. Bernasconi, M. Flepp, HIV transmission under highly active antiretroviral therapy, *Lancet.* 372 (2008) 1806–1807; author reply 1807.
- [178] S. Taylor, S. Davies, Antiretroviral drug concentrations in the male and female genital tract: implications for the sexual transmission of HIV, *Curr Opin HIV AIDS.* 5 (2010) 335–343.
- [179] H. Zhang, G. Dornadula, M. Beumont, L. Livornese Jr, B. Van Uiter, K. Henning, et al., Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1803–1809.
- [180] T. Bourlet, C. Cazorla, P. Berthelot, F. Grattard, F. Cognasse, A. Fresard, et al., Compartmentalization of HIV-1 according to antiretroviral therapy: viral loads are correlated in blood and semen but poorly in blood and saliva, *AIDS.* 15 (2001) 284–285.
- [181] A.-G. Marcelin, R. Tubiana, S. Lambert-Niclot, G. Lefebvre, S. Dominguez, M. Bonmarchand, et al., Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma, *AIDS.* 22 (2008) 1677–1679.
- [182] P.M. Sheth, C. Kovacs, K.S. Kemal, R.B. Jones, J.M. Raboud, R. Pilon, et al., Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy, *AIDS.* 23 (2009) 2050–2054.
- [183] M. Stürmer, H.W. Doerr, A. Berger, P. Gute, Is transmission of HIV-1 in non-viraemic serodiscordant couples possible?, *Antivir. Ther. (Lond.).* 13 (2008) 729–732.
- [184] M. Merbah, A. Introini, W. Fitzgerald, J.-C. Grivel, A. Lisco, C. Vanpouille, et al., Cervico-vaginal tissue ex vivo as a model to study early events in HIV-1 infection, *Am. J. Reprod. Immunol.* 65 (2011) 268–278.
- [185] K.K. Ariën, J.K. Kyongo, G. Vanham, Ex vivo models of HIV sexual transmission and microbicide development, *Curr. HIV Res.* 10 (2012) 73–78.
- [186] J. Cohen, Breakthrough of the year. HIV treatment as prevention, *Science.* 334 (2011) 1628.
- [187] Y. Van Herreweghe, J. Michiels, A. Waeytens, G. De Boeck, E. Salden, L. Heyndrickx, et al., A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides, *Antiviral Res.* 74 (2007) 111–124.
- [188] P. Lawrence, A. Zimmer, S. Paul, Infection muqueuse par le virus VIH-1: mécanismes, conséquences, perspectives de vaccination, *Revue Francophone Des Laboratoires.* 2009 (2009) 45–54.

- [189] D.C. Sokal, Q.A. Karim, S. Sibeko, N. Yende-Zuma, L.E. Mansoor, C. Baxter, et al., Safety of tenofovir gel, a vaginal microbicide, in South African women: results of the CAPRISA 004 Trial, *Antivir. Ther. (Lond.)*. (2012).
- [190] S.S. Abdool Karim, C. Baxter, Overview of microbicides for the prevention of human immunodeficiency virus, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 26 (2012) 427–439.
- [191] C. Kaushic, V.H. Ferreira, J.K. Kafka, A. Nazli, HIV infection in the female genital tract: discrete influence of the local mucosal microenvironment, *Am. J. Reprod. Immunol.* 63 (2010) 566–575.
- [192] M. Michelini, A. Rosellini, T. Simoncini, S. Papini, R.P. Revoltella, A three-dimensional organotypic culture of the human uterine exocervix for studying mucosal epithelial differentiation and migrating leukocytes, *Differentiation.* 72 (2004) 138–149.
- [193] Q. Li, P.J. Skinner, S.-J. Ha, L. Duan, T.L. Mattila, A. Hage, et al., Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection, *Science.* 323 (2009) 1726–1729.
- [194] M. Michelini, A. Rosellini, V. Mandys, T. Simoncini, R.P. Revoltella, Cytoarchitecture modifications of the human uterine endocervical mucosa in long-term three-dimensional organotypic culture, *Pathol. Res. Pract.* 201 (2005) 679–689.
- [195] B.K. Patterson, A. Landay, J. Andersson, C. Brown, H. Behbahani, D. Jiyamapa, et al., Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 481–490.
- [196] M. Bomsel, Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier, *Nat. Med.* 3 (1997) 42–47.
- [197] S.K. Lai, K. Hida, S. Shukair, Y.-Y. Wang, A. Figueiredo, R. Cone, et al., Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus, *J. Virol.* 83 (2009) 11196–11200.
- [198] M. Cremel, W. Berlier, H. Hamzeh, F. Cognasse, P. Lawrence, C. Genin, et al., Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 158–166.
- [199] W. Berlier, M. Cremel, H. Hamzeh, R. Lévy, F. Lucht, T. Bourlet, et al., Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV, *Hum. Reprod.* 21 (2006) 1135–1142.
- [200] R.A. Royce, A. Seña, W. Cates Jr, M.S. Cohen, Sexual transmission of HIV, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1072–1078.
- [201] J.N. Krieger, R.W. Coombs, A.C. Collier, D.D. Ho, S.O. Ross, J.E. Zeh, et al., Intermittent shedding of human immunodeficiency virus in semen: implications for sexual transmission, *J. Urol.* 154 (1995) 1035–1040.
- [202] A.J. Quayle, C. Xu, K.H. Mayer, D.J. Anderson, T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen, *J. Infect. Dis.* 176 (1997) 960–968.
- [203] J.A. Levy, The transmission of AIDS: the case of the infected cell, *JAMA.* 259 (1988) 3037–3038.
- [204] J.A. Levy, *HIV and the Pathogenesis of AIDS*, ASM Press, 2007.
- [205] R. Pearce-Pratt, D.M. Phillips, Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus, *Biol. Reprod.* 48 (1993) 431–445.
- [206] B. Muciaccia, S. Corallini, E. Vicini, F. Padula, L. Gandini, G. Liuzzi, et al., HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects, *Hum. Reprod.* 22 (2007) 2868–2878.
- [207] S. Bozzini, V. Falcone, P.G. Conaldi, L. Visai, L. Biancone, A. Dolei, et al., Heparin-binding domain of human fibronectin binds HIV-1 gp120/160 and reduces virus infectivity, *J. Med. Virol.* 54 (1998) 44–53.
- [208] F.C. Denison, V.E. Grant, A.A. Calder, R.W. Kelly, Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin-10 release, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 220–226.



- [209] D.J. Sharkey, A.M. Macpherson, K.P. Tremellen, S.A. Robertson, Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells, *Mol. Hum. Reprod.* 13 (2007) 491–501.
- [210] J. Sabatté, A. Ceballos, S. Raiden, M. Vermeulen, K. Nahmod, J. Maggini, et al., Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4<sup>+</sup> T cells mediated by DC-SIGN, *J. Virol.* 81 (2007) 13723–13734.
- [211] J.K. Kafka, P.M. Sheth, A. Nazli, B.J. Osborne, C. Kovacs, R. Kaul, et al., Endometrial epithelial cell response to semen from HIV-infected men during different stages of infection is distinct and can drive HIV-1-long terminal repeat, *AIDS.* 26 (2012) 27–36.
- [212] C.J. Miller, Q. Li, K. Abel, E.-Y. Kim, Z.-M. Ma, S. Wietgreffe, et al., Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus, *J. Virol.* 79 (2005) 9217–9227.
- [213] J. Hu, M.B. Gardner, C.J. Miller, Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells, *J. Virol.* 74 (2000) 6087–6095.
- [214] S.A. Robertson, Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract, *Cell Tissue Res.* 322 (2005) 43–52.
- [215] A.M. Fox-Canale, T.J. Hope, J. Martinson, J.R. Lurain, A.W. Rademaker, J.W. Bremer, et al., Human cytomegalovirus and human immunodeficiency virus type-1 co-infection in human cervical tissue, *Virology.* 369 (2007) 55–68.
- [216] J. Coleman, J. Hitti, C. Mwachari, A. Muliro, R. Nguti, R. Gausman, et al., Infectious correlates of HIV-1 shedding in the female u... [AIDS. 2007] - PubMed - NCBI, (2007).
- [217] M.J. Lusk, P. Konecny, Cervicitis: a review, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21 (2008) 49–55.
- [218] P. Gupta, K.B. Collins, D. Ratner, S. Watkins, G.J. Naus, D.V. Landers, et al., Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system, *J. Virol.* 76 (2002) 9868–9876.
- [219] M.K. Norvell, G.I. Benrubi, R.J. Thompson, Investigation of microtrauma after sexual intercourse, *J Reprod Med.* 29 (1984) 269–271.
- [220] A.L. Howell, R.D. Edkins, S.E. Rier, G.R. Yeaman, J.E. Stern, M.W. Fanger, et al., Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract, *J. Virol.* 71 (1997) 3498–3506.
- [221] M.-P. Carreno, N. Chomont, M.D. Kazatchkine, T. Irinopoulou, C. Krief, A.-S. Mohamed, et al., Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells, *J. Virol.* 76 (2002) 32–40.
- [222] B. Sallé, P. Brochard, O. Bourry, A. Mannioui, T. Andrieu, S. Prevot, et al., Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus, *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 337–344.
- [223] H. Hocini, P. Becquart, H. Bouhlal, N. Chomont, P. Ancuta, M.D. Kazatchkine, et al., Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells, *J. Virol.* 75 (2001) 5370–5374.
- [224] K.B. Collins, B.K. Patterson, G.J. Naus, D.V. Landers, P. Gupta, Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract, *Nat. Med.* 6 (2000) 475–479.
- [225] S. Pang, D. Yu, D.S. An, G.C. Baldwin, Y. Xie, B. Poon, et al., Human immunodeficiency virus Env-independent infection of human CD4(-) cells, *J. Virol.* 74 (2000) 10994–11000.
- [226] K.H. Mayer, D.J. Anderson, Heterosexual HIV transmission, *Infect Agents Dis.* 4 (1995) 273–284.
- [227] X. Tan, D.M. Phillips, Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus, *Arch. Virol.* 141 (1996) 1177–1189.

- [228] S. Di Fabio, G. Giannini, C. Lapenta, M. Spada, A. Binelli, E. Germinario, et al., Vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice: a new model for the evaluation of vaginal microbicides, *AIDS*. 15 (2001) 2231–2238.
- [229] S.N. Asin, M.W. Fanger, D. Wildt-Perinic, P.L. Ware, C.R. Wira, A.L. Howell, Transmission of HIV-1 by primary human uterine epithelial cells and stromal fibroblasts, *J. Infect. Dis.* 190 (2004) 236–245.
- [230] Handbook of Biological Confocal Microscopy - James B. Pawley - Google Livres, (n.d.).
- [231] B. Brandenburg, X. Zhuang, Virus trafficking - learning from single-virus tracking, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 197–208.
- [232] B. Huang, M. Bates, X. Zhuang, Super-resolution fluorescence microscopy, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 993–1016.
- [233] B. Müller, J. Daecke, O.T. Fackler, M.T. Dittmar, H. Zentgraf, H.-G. Kräusslich, Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative, *J. Virol.* 78 (2004) 10803–10813.
- [234] C. Jolly, K. Kashefi, M. Hollinshead, Q.J. Sattentau, HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 283–293.
- [235] E.M. Campbell, T.J. Hope, Live cell imaging of the HIV-1 life cycle, *Trends Microbiol.* 16 (2008) 580–587.
- [236] C.M. Danielson, T.J. Hope, Imaging of HIV/host protein interactions, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 339 (2009) 103–123.
- [237] C.B. Huang, Y.V. Alimova, J.L. Ebersole, HIV-1 reactivation in HIV-latently infected dendritic cells by oral microorganisms and LPS, *Cell. Immunol.* 268 (2011) 105–111.
- [238] W. Hübner, G.P. McNerney, P. Chen, B.M. Dale, R.E. Gordon, F.Y.S. Chuang, et al., Quantitative 3D Video Microscopy of HIV Transfer Across T Cell Virological Synapses, *Science*. 323 (2009) 1743–1747.
- [239] S. Ivanchenko, W.J. Godinez, M. Lampe, H.-G. Kräusslich, R. Eils, K. Rohr, et al., Dynamics of HIV-1 assembly and release, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000652.
- [240] J.D. Lewis, G. Destito, A. Zijlstra, M.J. Gonzalez, J.P. Quigley, M. Manchester, et al., Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging, *Nat. Med.* 12 (2006) 354–360.
- [241] B.M. Dale, G.P. McNerney, W. Hübner, T.R. Huser, B.K. Chen, Tracking and quantitation of fluorescent HIV during cell-to-cell transmission, *Methods*. 53 (2011) 20–26.
- [242] J. Daecke, O.T. Fackler, M.T. Dittmar, H.-G. Kräusslich, Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry, *J. Virol.* 79 (2005) 1581–1594.
- [243] M. Eckhardt, M. Anders, W. Muranyi, M. Heilemann, J. Krijnse-Locker, B. Müller, A SNAP-tagged derivative of HIV-1—a versatile tool to study virus-cell interactions, *PLoS ONE*. 6 (2011) e22007.
- [244] N.C. Shaner, G.H. Patterson, M.W. Davidson, Advances in fluorescent protein technology, *J. Cell. Sci.* 120 (2007) 4247–4260.
- [245] W. Hübner, P. Chen, A. Del Portillo, Y. Liu, R.E. Gordon, B.K. Chen, Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1, *J. Virol.* 81 (2007) 12596–12607.
- [246] T. Goto, M. Nakai, K. Ikuta, The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1, *Micron*. 29 (1998) 123–138.
- [247] N. Arhel, A. Genovesio, K.-A. Kim, S. Miko, E. Perret, J.-C. Olivo-Marin, et al., Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes, *Nat. Methods*. 3 (2006) 817–824.
- [248] B.A. Griffin, S.R. Adams, R.Y. Tsien, Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells, *Science*. 281 (1998) 269–272.
- [249] K. Stroffekova, C. Proenza, K.G. Beam, The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins, *Pflugers Arch.* 442 (2001) 859–866.

- [250] A.C. Hearps, M.J. Pryor, H.V. Kuusisto, S.M. Rawlinson, S.C. Pillar, D.A. Jans, The biarsenical dye Lumio exhibits a reduced ability to specifically detect tetracysteine-containing proteins within live cells, *J Fluoresc.* 17 (2007) 593–597.
- [251] R. Shen, H.E. Richter, R.H. Clements, L. Novak, K. Huff, D. Bimczok, et al., Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Virol.* 83 (2009) 3258–3267.
- [252] W. Nittayananta, F. Hladik, M. Klausner, S. Harb, B.A. Dale, R.W. Coombs, HIV type 1 fails to trigger innate immune factor synthesis in differentiated oral epithelium, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 25 (2009) 1013–1021.
- [253] E.M. Campbell, O. Perez, M. Melar, T.J. Hope, Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell, *Virology.* 360 (2007) 286–293.
- [254] Y. Gali, K.K. Ariën, M. Praet, R. Van den Bergh, M. Temmerman, O. Delezay, et al., Development of an in vitro dual-chamber model of the female genital tract as a screening tool for epithelial toxicity, *J. Virol. Methods.* 165 (2010) 186–197.
- [255] J.M. Harouse, A. Gettie, R.C. Tan, J. Blanchard, C. Cheng-Mayer, Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs, *Science.* 284 (1999) 816–819.
- [256] P.N. Fultz, H.M. McClure, H. Daugharty, A. Brodie, C.R. McGrath, B. Swenson, et al., Vaginal transmission of human immunodeficiency virus (HIV) to a chimpanzee, *J. Infect. Dis.* 154 (1986) 896–900.
- [257] C. Masurier, B. Salomon, N. Guettari, C. Pioche, F. Lachapelle, M. Guigon, et al., Dendritic cells route human immunodeficiency virus to lymph nodes after vaginal or intravenous administration to mice, *J. Virol.* 72 (1998) 7822–7829.
- [258] C.J. Miller, N.J. Alexander, P. Vogel, J. Anderson, P.A. Marx, Mechanism of genital transmission of SIV: a hypothesis based on transmission studies and the location of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques, *J. Med. Primatol.* 21 (1992) 64–68.
- [259] P. Lawrence, D. Portran, R. Terrasse, S. Palle, T. Olivier, J. Fantini, et al., Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma, *AIDS.* 26 (2012) 785–796.
- [260] W. Hübner, P. Chen, A. Del Portillo, Y. Liu, R.E. Gordon, B.K. Chen, Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1, *J. Virol.* 81 (2007) 12596–12607.
- [261] J.A. Politch, K.H. Mayer, D.J. Anderson, Depletion of CD4+ T cells in semen during HIV infection and their restoration following antiretroviral therapy, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 50 (2009) 283–289.
- [262] D.J. Anderson, E.J. Yunis, “Trojan Horse” leukocytes in AIDS, *N. Engl. J. Med.* 309 (1983) 984–985.
- [263] S.K. Pillai, B. Good, S.K. Pond, J.K. Wong, M.C. Strain, D.D. Richman, et al., Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env, *J. Virol.* 79 (2005) 1734–1742.
- [264] K. Diem, D.C. Nickle, A. Motoshige, A. Fox, S. Ross, J.I. Mullins, et al., Male genital tract compartmentalization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV), *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 24 (2008) 561–571.

La transmission hétérosexuelle de HIV de l'homme vers la femme est le principal mode de contamination dans le monde. Il implique la mise en contact du sperme infecté avec la muqueuse génitale féminine saine, puis le passage du virus libre ou associé aux cellules à travers la muqueuse. Les mécanismes impliqués dans la transmission de HIV de l'homme vers la femme ainsi que l'impact du plasma séminal sur la transmission sélective des virus à tropisme R5 sont encore mal connus.

Au cours de mon séjour doctoral nous avons visualisé le passage du virus associé aux cellules ainsi que du virus libre à travers la muqueuse génitale endocervicale. Dans un premier temps l'étude s'est focalisée sur la transmigration de cellules immunitaires infectées par HIV à travers un modèle in vitro de muqueuse endocervicale reconstruite, ainsi que sur le rôle du plasma séminal dans la transmission de HIV et la sélection des virus à tropisme R5. Par la suite, un virus chimérique fluorescent, répliquatif et infectieux, permettant sa détection par microscopie confocale sur plusieurs cycles de réplication, a été développé. Après mise en contact de ce virus chimérique, à tropisme X4 ou R5, avec la muqueuse endocervicale, nous avons visualisé par microscopie confocale l'infection des cellules épithéliales endocervicales et la transmission de HIV à des cellules immunitaires disposées au pôle basal. L'utilisation d'un modèle mathématique nous a permis de standardiser et quantifier la détection de cellules infectées dans la muqueuse.

Mes travaux de thèse décrivent dans un premier temps l'importance du passage de HIV associé aux cellules dans la transmission hétérosexuelle, ainsi que l'implication du plasma séminal dans la sélection des virus à tropisme R5. De plus, le modèle virologique développé permet de visualiser directement la transmission hétérosexuelle de HIV à travers la muqueuse génitale féminine. J'ai ainsi démontré qu'il est possible de visualiser directement, de localiser et de quantifier la présence du virus au sein de la muqueuse. Cet outil virologique permettra d'approfondir les connaissances et la compréhension des mécanismes impliqués dans la transmission hétérosexuelle de HIV et dans la sélection des virus à tropisme R5.

Heterosexual transmission of HIV from men to women is the main route of contamination by this agent worldwide. This mode of transmission involves the contact between infected semen and healthy female genital mucosa, and then the crossing of cell-free or cell-associated viruses through the mucosa. The mechanisms involved in HIV transmission from men to women as well as the role of seminal plasma in selective transmission of R5-tropic viruses stay partially unknown.

During the course of my PhD we visualized the crossing of cell-associated and cell-free virus through the endocervical genital mucosa. Initially, the study focused on the transmigration of infected immune cells through an in vitro model of endocervical mucosa, as well as on the role of seminal plasma in HIV transmission and selection of R5-tropic strains. Afterwards, we developed a fluorescent, replicative competent, infectious chimeric virus allowing its detection by confocal microscopy after several replication cycles. After contact of the endocervical mucosa with X4- or R5-tropic chimeric viruses, we visualized by confocal microscopy the infection of endocervical epithelial cells and the transmission of HIV to immune cells placed in the basal compartment. The use of a mathematical model allowed standardizing and quantifying the detection of infected cells in the mucosa.

My PhD work describes as a first step the importance of the crossing of cell-associated HIV particles in the heterosexual transmission, as well as the involvement of seminal plasma in the selection of R5-tropic strains. Moreover, the virological model developed herein allows the direct visualization of HIV transmission through the female genital mucosa. I have thus demonstrated that it is possible to localize and quantify viral particles within the mucosa. This virological tool help to better understand the mechanisms involved in HIV heterosexual transmission and the selection of R5-tropic strains.